

**IMMUNISATION À L'ADN AVEC UN PLASMIDE CODANT POUR LA  
GLYCOPROTÉINE E2 DU VIRUS DE LA DIARRHÉE BOVINE:  
EFFET DE LA LOCALISATION ET DE LA VOIE D'INJECTION SUR  
LA RÉPONSE IMMUNITAIRE**

par

**Steve St-Onge**

Mémoire présenté au département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

**FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2000**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-67331-6**

**Canada**

Le 15 juin 2000 , le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.  
date

**Président-rapporteur:** M. Richard Blouin  
Département de biologie

**Membre:** M. Denis LeBel  
Département de biologie

**Membre:** M. Brian Talbot  
Département de biologie

## **SOMMAIRE**

Le virus de la diarrhée bovine (BVDV) représente un agent étiologique majeur pour l'industrie bovine. En effet, ce virus fut responsable de la mort de plus de 25% des veaux lors d'une épidémie au Québec en 1993. Des études ont démontré que les isolats responsables de cette épidémie se distinguent génotypiquement des souches conventionnelles. On leur conféra le génotype II.

L'inefficacité des vaccins conventionnels dans l'établissement d'une immunité durable contre ces nouvelles souches poussent les chercheurs à se tourner vers les vaccins recombinants afin de contrôler la maladie. La protéine E2 (gp53) est la plus immunodominante du BVDV. Elle induit la production d'anticorps capables de neutraliser l'infection virale. L'utilisation de son gène pour la vaccination à l'ADN permet non seulement la génération d'anticorps neutralisants, mais également de conférer une protection partielle contre le virus. La mise au point d'un vaccin génétique de seconde génération, dans le but d'obtenir une protection complète, constituait le but de ce projet de recherche.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'effet de la localisation de gp53, en enlevant la portion transmembranaire de son gène (gp53 $\Delta$ TMR), et de la voie d'injection sur la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Malgré que la forme tronquée génère une production d'anticorps plus importante indépendamment de la voie, elle donne une réponse cellulaire beaucoup plus faible. Cela suggère que la portion C-terminale de la protéine abrite un épitope T, c'est-à-dire d'une séquence d'acides aminés stimulant la réponse des cellules T. De plus, nous avons obtenu des anticorps neutralisants.

Dans la seconde partie du projet, nous avons criblé les gènes p20, p14, gp48 et gp25 du BVDV dans un vaccin à l'ADN. La caractérisation immunologique nous laisse croire en la présence potentielle d'un faible épitope T, vu une minime production d'IL-2, parmi ces gènes. Des études plus détaillées devront être effectuées afin d'en cibler le gène responsable.



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le docteur Brian Talbot, pour son côté humain et son support tout au long de ma maîtrise. J'aimerais dédier une mention spéciale aux docteurs Richard Blouin et Denis LeBel qui ont su apporter de la rigueur à mon travail de par leurs critiques constructives. Je suis aussi reconnaissant envers le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour leur apport financier au projet.

Je voudrais dire merci au docteur Serge Harpin pour l'intéressante collaboration ainsi qu'à M. Gilles Grondin pour son professionnalisme avec les expériences impliquant la microscopie et les coupes histologiques.

Je suis particulièrement reconnaissant envers Max, Pat, Guil, Chantoune, Julie, André, Gen, Fern, Sophie, Éric et Driss pour les discussions intéressantes, les soupers et les activités.

Finalement, je tiens à remercier mes parents, non seulement pour leur aide financière et leurs encouragements dans les moments difficiles, mais également pour m'avoir inculqué la persévérance et l'effort au travail par leur exemple.

## **TABLE DES MATIÈRES**

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIVV</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XVII</b>
 <b>CHAPITRE I - INTRODUCTION .....</b>	 <b>1</b>
 <b>A) LE VIRUS DE LA DIARRHÉE BOVINE</b>	
<b>1.1 HISTORIQUE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 TAXONOMIE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 DIVERSITÉ DU BVDV .....</b>	<b>1</b>
<b>1.4 PATHOGENÈSE .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4.1 Infections aiguës .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4.2 Infections intra-utérines .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4.3 Maladie des muqueuses (MD) .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 IMPORTANCE ÉCONOMIQUE.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5.1 Pertes reliées à l'infection.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.2 Contamination du sérum bovin dans les cultures cellulaires .....</b>	<b>8</b>

<b>1.6 BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....</b>	<b>9</b>
1.6.1 Nomenclature .....	9
1.6.2 Organisation génomique .....	9
1.6.3 Traduction et maturation protéolytique .....	11
1.6.4 Protéines du BVDV .....	13
1.6.4.1 Protéines structurales .....	13
1.6.4.2 Protéines non-structurales.....	14
<b>1.7 IMMUNOLOGIE .....</b>	<b>15</b>
1.7.1 Réponse humorale.....	15
1.7.2 Réponse cytotoxique.....	16
<b>1.8 PRÉVENTION ET CONTRÔLE DES INFECTIONS AU BVDV .....</b>	<b>16</b>
1.8.1 Retrait des animaux infectés en persistance.....	17
1.8.2 Vaccination .....	17
1.8.2.1 Vaccins conventionnels .....	18
1.8.2.1.1 Vaccins inactivés .....	18
1.8.2.1.2 Vaccins atténués.....	19
1.8.2.2 Vaccins recombinants .....	20
1.8.2.2.1 Vaccins à sous-unités.....	22
1.8.2.2.2 Vecteurs viraux .....	22
1.8.2.2.3 Immunisation à l'ADN .....	24

## **B) Immunisation à l'ADN**

<b>1.9 POURQUOI VACCINER À L'ADN ? .....</b>	<b>25</b>
<b>1.10 HISTORIQUE .....</b>	<b>25</b>
<b>1.11 PRINCIPE .....</b>	<b>26</b>

1.12 COMPARAISON DES MÉTHODES DE VACCINATION .....	27
1.13 COMPOSITION DU VECTEUR.....	29
1.14 PROCESSING ET PRÉSENTATION DE L'ANTIGÈNE.....	30
1.14.1 Initiation d'une réponse CTL médiée par les CD8 <sup>+</sup> .....	30
1.14.2 Initiation d'une réponse T CD4 <sup>+</sup> .....	30
1.15 RÉPONSE IMMUNITAIRE GÉNÉRÉE PAR VACCINATION GÉNÉTIQUE.....	31
1.15.1 Réponse humorale.....	31
1.15.2 Réponse cellulaire .....	32
1.15.2.1 Réponse T auxiliaire .....	32
1.15.2.2 Réponse cytotoxique .....	33
1.16 EFFET D'ADJUVANT DE L'ADN.....	34
1.17 PROTECTION CONTRE LES MALADIES VIRALES .....	35
1.18 STRATÉGIES D'OPTIMISATION .....	36
1.18.1 Effet de la voie d'injection.....	36
1.18.2 Localisation de l'antigène .....	37
1.19 SÉCURITÉ .....	39
1.19.1 Intégration dans le génome .....	39
1.19.2 Induction de maladies autoimmunes.....	39
1.19.3 Induction de tolérance.....	40

## C) OBJECTIFS

1.20 MISE EN CONTEXTE.....	41
1.21 PROBLÉMATIQUE ET EXPÉRIENCE PRÉLIMINAIRE .....	42

1.22 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES .....	43
 CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
 2.1 SOUCHES VIRALES DE BVDV .....	44
2.2 PROPAGATION DU BVDV .....	44
2.2.1 Culture cellulaire.....	44
2.2.2 Infection .....	45
2.3 PRÉPARATIONS VIRALES .....	45
2.3.1 Préparation de l'extrait viral pour le test ÉLISA .....	46
2.3.2 Purification sommaire du virus pour le test de prolifération .....	46
2.3.3 Préparation d'un stock de virus pour la séroneutralisation .....	47
2.4 TITRATION DU BVDV .....	47
2.4.1 Immunoperoxydase .....	48
2.5 PLASMIDES.....	49
2.6 AMPLIFICATION DE GP53Δ PAR PCR.....	49
2.7 CLONAGE ET SOUS-CLONAGES DU PRODUIT DE PCR ET DE GP53 .....	51
2.7.1 Préparation du vecteur pcDNA3 .....	51
2.7.2 Clonage de gp53ΔTMR dans le pcDNA3 .....	51
2.7.3 Sous-clonage de gp53 et gp53ΔTMR dans le pCMVi.....	52
2.7.4 Sous-clonage de gp53 et sa forme tronquée dans pSecTagB .....	53
2.7.5 Séquençage des constructions.....	53
2.8 TRANSFECTION ET DÉTECTION DE L'EXPRESSION DES CONSTRUCTIONS .....	54
2.8.1 Immunofluorescence .....	54

2.8.2 Radioimmunoprécipitation de gp53.....	55
2.8.2.1 Marquage des protéines néosynthétisées .....	55
2.8.2.2 Lyse cellulaire .....	56
2.8.2.3 Immunoprécipitation.....	56
2.8.2.4 SDS-PAGE et autoradiographie .....	57
2.9 IMMUNISATIONS ET PRÉLÈVEMENTS SANGUINS .....	57
2.9.1 Prélèvements de sang .....	58
2.10 CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE HUMORALE.....	59
2.10.1 Standardisation du test ÉLISA pour la détection des IgG totaux .....	59
2.10.2 Mesure des IgG totaux dirigés contre le BVDV par ÉLISA .....	59
2.10.3 Isotypage des anticorps dirigés contre le BVDV .....	60
2.10.4 Séroneutralisation .....	60
2.11 CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE .....	61
2.11.1 Test de prolifération des lymphocytes T murins.....	61
2.11.2 Dosage de cytokines .....	62
2.11.2.1 Dosage de l'IL-2 .....	62
2.11.2.2 Dosage de l'IL-4 .....	63
2.11.2.3 Dosage de l'IFN- $\gamma$ .....	64
2.11.3 Test de cytotoxicité.....	65
CHAPITRE III - RÉSUTATS.....	66
3.1 AMPLIFICATION DE GP53 $\Delta$ TMR PAR PCR, CLONAGE ET SÉQUENÇAGE .....	66
3.2 COMPARAISON DES GÈNES CODANT POUR GP53 ET GP53 $\Delta$ TMR .....	66
3.3 EXPRESSION DES CONSTRUCTIONS ET SÉCRÉTION DE GP53 $\Delta$ TMR .....	70

A) CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE HUMORALE .....	73
3.4 STANDARDISATION D'UN TEST ÉLISA POUR DÉTECTER LES PROTÉINES DU BVDV.....	73
3.4.1 Type de plaque .....	73
3.4.2 Agent de blocage.....	75
3.4.3 Dilution de l'anticorps secondaire et du conjugué.....	75
3.5 EFFET DE LA LOCALISATION DE GP53 SUR LA RÉPONSE HUMORALE .....	78
3.6 EFFET DE LA VOIE D'INJECTION SUR LA RÉPONSE HUMORALE CONTRE GP53 .....	81
3.7 ABSENCE D'ANTICORPS CONTRE P20, P14, GP48 ET GP25 .....	83
3.8 PRODUCTION D'ANTICORPS NEUTRALISANTS .....	84
3.9 PRODUCTION MIXTE DES ISOTYPES D'IMMUNOGLOBULINES PAR GP53 .....	85
B) CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE.....	90
3.10 EFFET DE LA LOCALISATION DE GP53 SUR LA RÉPONSE CELLULAIRE.....	90
3.11 EFFET DE LA VOIE D'INJECTION SUR LA RÉPONSE CELLULAIRE CONTRE GP53 .....	95
3.12 RÉPONSE CELLULAIRE DIRIGÉE CONTRE P20, P14, GP25 ET GP48.....	98
CHAPITRE IV - DISCUSSION.....	99
4.1 EFFET DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE GP53.....	99
4.2 EFFET DE LA VOIE D'INJECTION DE GP53 .....	100
4.3 IMMUNITÉ CONTRE PCMVp20.62 .....	100
4.4 RÉPONSE HÉTÉROLOGUE CONTRE LE BVDV PAR VACCINATION À L'ADN AVEC GP53 ...	101

<b>4.5 USAGE D'UN RÉGIME D'IMMUNISATION DIFFÉRENTIEL POUR AMPLIFIER LA RÉPONSE</b>	
<b>CELLULAIRE .....</b>	<b>102</b>
<b>4.6 AUTRES AVENUES POUR LA VACCINATION .....</b>	<b>103</b>
<b>4.6.1 Immunisation contre gp48 .....</b>	<b>105</b>
<b>4.6.2 Identification d'épitopes cytotoxiques .....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>107</b>
<b>ANNEXE 1 - EXEMPLE DE CALCUL DU TCID<sub>50</sub> .....</b>	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>110</b>



## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>5'UTR</b>	<b>Région 5' non-codante</b>
<b>a.a.</b>	<b>Acide aminé</b>
<b>AEC</b>	<b>3-amino-9-éthylcarbazole</b>
<b><math>\alpha</math></b>	<b>Anti</b>
<b>APC</b>	<b>Cellule présentatrice</b>
<b>APCp</b>	<b>Cellule présentatrice professionnelle</b>
<b>ATCC</b>	<b>American type culture collection</b>
<b>BVDV</b>	<b>Virus de la diarrhée bovine</b>
<b>cDNA</b>	<b>ADN complémentaire</b>
<b>Ci</b>	<b>Curie</b>
<b>CMH</b>	<b>Complexe majeur d'histocompatibilité</b>
<b>CMH I</b>	<b>Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I</b>
<b>CMH II</b>	<b>Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II</b>
<b>CMV</b>	<b>Cytomégalovirus</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Monoxyde de carbone</b>
<b>Con A</b>	<b>Concanavaline A</b>
<b>cp</b>	<b>souche cytopathogène</b>
<b>CS</b>	<b>Sérum de veau</b>
<b>CTL</b>	<b>Lymphocyte T cytotoxique</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b>
<b>DMEM-</b>	<b>Milieu DMEM sans méthionine ni cystéine</b>
<b>DMF</b>	<b>N,N-diméthylformamide</b>
<b>DMSO</b>	<b>Diméthylsulfoxyde</b>
<b>DO</b>	<b>Densité optique</b>
<b>dNTP</b>	<b>Déoxyribonucléotide triphosphate</b>
<b>DTT</b>	<b>Dithiothréol</b>

<b>EDTA</b>	<b>Éthylènediamine tétraacétate</b>
<b>FBS</b>	<b>Sérum foetal de boeuf</b>
<b>G-418</b>	<b>Généticine</b>
<b>gp53</b>	<b>Glycoprotéine 53</b>
<b>gp53ΔTMR</b>	<b>Glycoprotéine 53 sans la portion transmembranaire</b>
<b>HBSS</b>	<b>Hank's Buffered Saline</b>
<b>HCC</b>	<b>Hexammincobalt chloride</b>
<b>HRP</b>	<b>Horseradish peroxydase</b>
<b>HS</b>	<b>Sérum de cheval</b>
<b><sup>3</sup>H-TdR</b>	<b>Thymidine tritiée</b>
<b>i.d.</b>	<b>Voie d'injection intradermique</b>
<b>ID<sub>50</sub></b>	<b>Dose infectieuse 50%</b>
<b>IFN</b>	<b>Interféron</b>
<b>Ig</b>	<b>Immunoglobuline</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukine</b>
<b>i.m.</b>	<b>Voie d'injection intramusculaire</b>
<b>IRES</b>	<b>Site d'entrée au ribosome</b>
<b>LB</b>	<b>Luria Broth</b>
<b>MD</b>	<b>Maladie des muqueuses</b>
<b>MDBK</b>	<b>Fibroblastes de rein bovin (Madin-Darby)</b>
<b>MOI</b>	<b>Multiplicité d'infection</b>
<b>NaN<sub>3</sub></b>	<b>Azide de sodium</b>
<b>ncp</b>	<b>Souche non-cytopathogène</b>
<b>nt</b>	<b>nucléotide</b>
<b>O/N</b>	<b>Incubation de 16 heures</b>
<b>OPA</b>	<b>Tampon One-Phor-All PLUS de Amersham Pharmacia Biotech</b>
<b>ORF</b>	<b>Open reading frame</b>
<b>pb</b>	<b>Paires de bases</b>
<b>PBS</b>	<b>Saline tamponnée au phosphate</b>

<b>PCR</b>	<b>Polymerase chain reaction</b>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>Prostaglandine E<sub>2</sub></b>
<b>P.I.</b>	<b>Animal infecté en persistance</b>
<b>P.M.</b>	<b>Poids moléculaire</b>
<b>PMSF</b>	<b>Phényl méthyl sulfonyl fluoride</b>
<b>RSV</b>	<b>Rous sarcoma virus</b>
<b>RT</b>	<b>Température de la pièce</b>
<b>SDS</b>	<b>Sodium dodécyl sulfate</b>
<b>Sig</b>	<b>Immunoglobuline de surface</b>
<b>S.I.</b>	<b>Indice de stimulation</b>
<b>TB</b>	<b>Terrific Broth</b>
<b>TCID<sub>50</sub></b>	<b>Dose infectieuse infectant 50% des cultures tissulaires</b>
<b>Th</b>	<b>Lymphocyte T auxiliaire</b>
<b>TMB</b>	<b>3,3,5,5-tétraméthylbenzidine</b>
<b>TMR</b>	<b>Transmembranaire</b>
<b>xg</b>	<b>Force centrifuge à laquelle un échantillon est soumis</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

1.	Caractéristiques des vaccins conventionnels contre le BVDV.....	21
2.	Comparaison des vaccins à l'ADN avec les différents types de vaccin existant.....	28
3.	Voies d'injections des plasmides selon le groupe d'immunisation..	58
4.	Sélection du type de plaque pour l'ÉLISA pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV.....	74
5.	Sélection de l'agent de blocage pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV par ÉLISA.....	76
6.	Détermination de la dilution d'anticorps secondaire optimale pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV par ÉLISA.....	77
7.	Détermination de la dilution optimale du complexe streptavidine-HRP pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV par ÉLISA.....	77
8.	Séroconversion des souris envers les protéines du BVDV après vaccination à l'ADN.....	79
9.	Titres d'anticorps des souris séroconverties 15 semaines après l'injection initiale.....	82

10.	Titres d'anticorps neutralisants contre les souches Singer et 125 du BVDV 13 semaines après la première injection.....	85
11.	Isotypes des anticorps produits par les souris séroconverties 15 semaines après l'injection initiale.....	86
12.	Régimes d'immunisation différentiels combinant la vaccination à l'ADN et les vecteurs recombinants.....	104

## **LISTE DES FIGURES**

1.	Classification du BVDV.....	2
2.	Effet du stade de gestation sur le fœtus lors de l'infection d'une vache gestante au BVDV.....	6
3.	Organisation génomique du BVDV.....	10
4.	Maturation protéolytique de la polyprotéine du BVDV.....	12
5.	Amorces utilisées pour amplifier le gène gp53 de la souche 93-1 sans la portion transmembranaire (gp53ΔTMR) par PCR.....	50
6.	Amplification de gp53ΔTMR par PCR.....	67
7.	Séquence du gène gp53 amplifié sans la portion TMR obtenue par séquençage.....	68
8.	Comparaison de la longueur de l'insert codant pour gp53 de celui codant pour la forme tronquée de gp53 (digestion <i>Bam</i> H I- <i>Xba</i> I).....	69
9.	Immunofluorescence de cellules COS-7 transfectées avec gp53, gp53ΔTMR et p20.62.....	71
10.	Sécrétion de gp53ΔTMR dans le surnageant.....	72

11.	Effet de la localisation et de la voie d'injection sur la cinétique de production des anticorps dirigés contre gp53 suite à la vaccination à l'ADN.....	80
12.	Cinétique de production des isotypes IgG1 et IgG2a dirigés contre le BVDV selon différentes souris séroconverties vaccinées à l'ADN.....	87
13.	Prolifération des splénocytes de souris vaccinées à l'ADN par la voie intramusculaire suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I) ou hétérologue (125; type II).....	91
14.	Prolifération des splénocytes de souris vaccinées à l'ADN par la voie intradermique suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I) ou hétérologue (125; type II).....	92
15.	Production d'IFN- $\gamma$ par les splénocytes de souris vaccinées à l'ADN suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I).....	93
16.	Production d'IL-2 par les splénocytes de souris vaccinées à l'ADN suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I).....	96





# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

### **A) LE VIRUS DE LA DIARRHÉE BOVINE**

#### **1.1 HISTORIQUE**

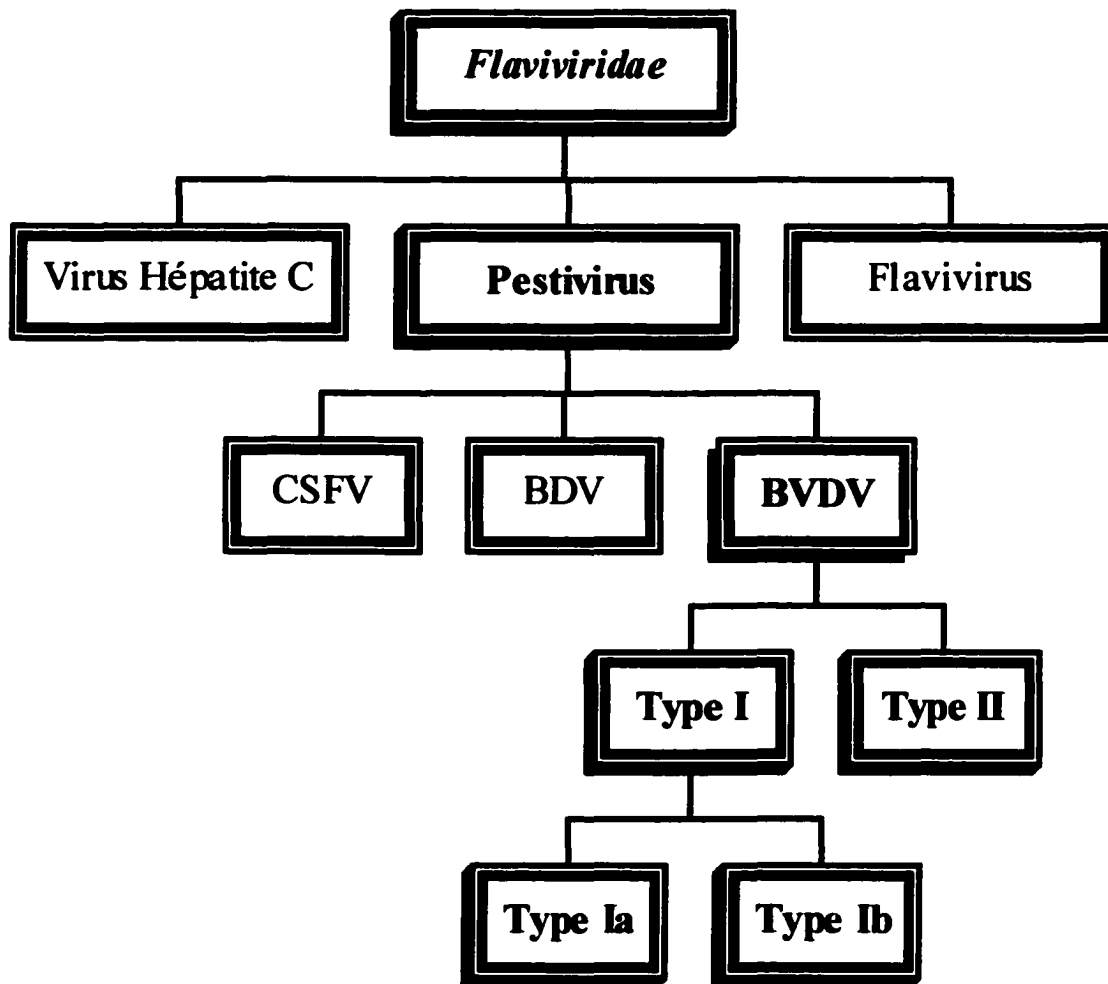
En 1946, Olafson et Childs décrivaient les symptômes d'une nouvelle maladie bovine transmissible (Olafson *et al.*, 1946; Childs, 1946). Olafson conclut que cette maladie était d'origine virale puisque le sang exempt de bactéries pouvait transmettre la maladie. Il nomma la maladie " diarrhée virale bovine " (bovine viral diarrhea) (Olafson et Rickard, 1947). Toutefois, quelques années furent nécessaires avant de mettre la main sur le virus responsable, soit le virus de la diarrhée bovine (BVDV) (Baker *et al.*, 1954).

#### **1.2 TAXONOMIE**

Ensemble avec le virus classique de la fièvre porcine (CSFV) et le virus de la maladie des frontières (BDV) affectant les moutons, le virus de la diarrhée bovine (BVDV) fait partie du genre Pestivirus de la famille *Flaviviridae* (Francki *et al.*, 1991) (figure 1). Selon leur ressemblance génétique et antigénique, les différentes souches de BVDV sont classées en deux génotypes, soit les génotypes I et II (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Harpin *et al.*, 1995). Le génotype I se subdivise en deux sous types, soit Ia et Ib (Pellerin *et al.*, 1994).

#### **1.3 DIVERSITÉ DU BVDV**

La classification de la diversité du virus BVD se fait selon trois critères. Outre les variations génomiques et antigéniques, les variations biotypiques servent également à



**Figure 1 : Classification du BVDV.**

différencier les souches. Le taux de mutation considérable des virus à ARN explique bien la provenance de la diversité génomique chez le BVDV. Pour les virus à ARN, une mutation survient sur  $10^3$  ou  $10^4$  bases incorporées dans le génome (Holland *et al.*, 1982). C'est pourquoi l'on retrouve des divergences de nucléotides de l'ordre de 25% dans l'ARN du BVDV (Pellerin *et al.*, 1994; Donis, 1995; van Rijn *et al.*, 1997). Toutefois, la distribution de ces différences n'est pas uniforme tout au long du génome. En effet, alors que la séquence du gène p80 représente peu de variations nucléotidiques, celle codant pour gp53 possède deux régions hypervariables (Donis, 1995). Puisque le matériel génétique code pour des protéines, les mutations engendrées au niveau des acides nucléiques entraînent d'importants changements sur les protéines synthétisées. Par exemple, il existe une différence de plus de 40 % au niveau des acides aminés de la portion N-terminale de E2 entre les génotype I et II du BVDV (Pellerin *et al.*, 1994; van Rijn *et al.*, 1997). L'étude des épitopes de gp53 des souches NADL et Oregon C24V par Paton en 1992 démontre qu'une seule mutation ponctuelle peut rendre le BVDV résistant à la neutralisation par un anticorps monoclonal. De telles variations en acides aminés chez les glycoprotéines du virus expliquent bien la provenance de la diversité antigénique entre les génotypes. Chaque génotype contient également des distinctions, notamment au niveau du biotype. Selon leur comportement en culture cellulaire, on retrouve les biotypes cytopathogène (cp) et non-cytopathogène (ncp) (Gillespie *et al.*, 1960). Le biotype cp induit une vacuolisation cytoplasmique et la mort des cellules environ 24-48 heures après l'infection (Horzinek, 1981). Aucune corrélation n'existe entre le biotype et la virulence, les deux biotypes pouvant être extrêmement virulents chez le bovin (Bolin et Ridpath, 1992).

## **1.4 PATHOGENÈSE**

Une infection par le BVDV se caractérise par tout un spectre de symptômes, allant de manifestations sous-cliniques jusqu'à la forme mortelle de la maladie, la maladie des muqueuses (MD). Les animaux infectés relâchent du virus dans l'environnement (Duffell et Harkness, 1985) et contribuent à la propagation de la maladie au reste du troupeau.

L'infection de vaches gestantes séronégatives peut conduire à la naissance d'un veau infecté en persistance.

#### ***1.4.1 Infections aiguës***

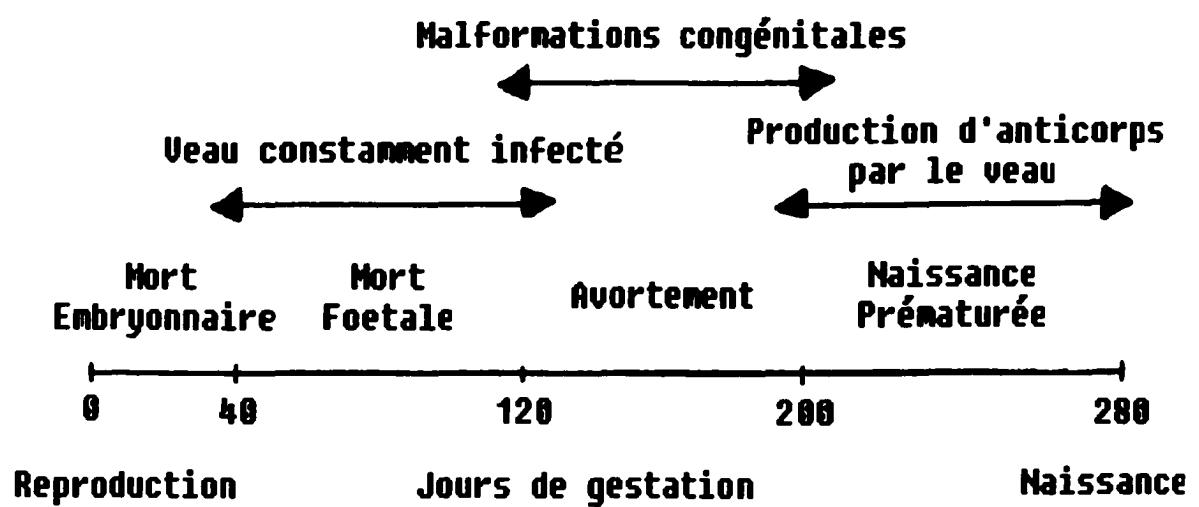
L'infection initiale avec le BVDV se produit normalement au niveau des voies respiratoires. En voyageant dans le sérum ou en association avec les lymphocytes et les monocytes (Brownlie, 1990), le virus peut ensuite s'étendre de façon systémique. Dans 70 à 90 % des cas d'infections au BVDV, aucun signe clinique ne se manifeste (Ames, 1986; Anderson, 1994). Lorsque des manifestations cliniques se présentent, on attribue ces signes à la maladie de la diarrhée bovine. Ces symptômes consistent en une toux, une fièvre transitoire, une leucopénie, une thrombocytopénie, des sécrétions nasales et oculaires abondantes ainsi que de faibles diarrhées (Baker, 1987). Suivant l'infection, la virémie persiste environ deux semaines après quoi l'animal développe des anticorps neutralisants (Duffell et Harkness, 1985). L'immunosuppression passagère causée par le BVDV entraîne souvent des infections secondaires relevant d'agents causant des maladies entériques (Brownlie, 1990) et respiratoires (Potgieter *et al.*, 1984). Allongeant considérablement la période de convalescence, ces maladies entraînent un fort taux de morbidité et de faibles taux de létalités au sein des animaux atteints. Récemment, des symptômes plus sévères et des taux de mortalité élevés ont touché les élevages de bovins en Amérique du Nord. Les souches responsables de ces épidémies font partie du génotype II et ont provoqué la mort de plus de 25 % des veaux lourds au Québec en 1993 (Pellerin *et al.*, 1994).

#### ***1.4.2 Infections intra-utérines***

Le BVDV possède la propriété de traverser la barrière placentaire lors de l'infection d'une vache gestante séronégative (Duffell et Harkness, 1985). Alors que la réponse foetale dépend du biotype viral ainsi que du stade de la gestation (Brownlie, 1990) (figure 2), les

symptômes de la vache gestante sont sensiblement les mêmes que ceux décrits pour une infection aiguë. Avant les 100 premiers jours de gestation, une infection avec le BVDV laisse souvent place à un avortement, une momification ou la mort du fœtus. Après 100 à 150 jours, le BVDV provoque de graves retards de croissance et malformations congénitales. Parmi les effets tératogènes, on retrouve une hypoplasie du cervelet et des poumons, l'aplasie du thymus, la microcéphalie, l'hypomyélogénèse et l'aplasie (Baker, 1990). Vers le 150<sup>e</sup> jour, le système immunitaire du fœtus devient fonctionnel et est en mesure d'éliminer le virus (Brownlie, 1990). Une infection avec le BVDV avec une souche ncp survenant entre le 50<sup>e</sup> et le 120<sup>e</sup> jour de gestation peut donc provoquer la naissance d'un veau infecté en persistance (PI) par le BVDV (McClurkin *et al.*, 1984). Incapable de discerner le virus comme étrangé dû à un système immunitaire immature, le fœtus le considère comme faisant partie intégrante de son organisme. L'immunotolérance ainsi engendrée envers le virus par le veau permettra à ce dernier de persister tout au long de la vie de l'animal. Toutefois, ces animaux demeurent immunocompétents envers les autres antigènes (McClurkin *et al.*, 1984) ainsi que les souches de BVDV hétérologues à la souche immunotolérée (Brownlie, 1990).

Source majeure du maintien du BVDV dans la population bovine, les animaux PI sécrètent le virus en grande quantité dans leur environnement (Niskanen *et al.*, 1995). On retrouve le virus dans les fèces, l'urine, les larmes, le lait, la salive, les écoulements nasaux et même dans le sperme des animaux (Radostits et Littlejohns, 1988). Le contact direct d'un animal sain avec la plupart des sécrétions d'un animal PI constitue le principal moyen de transmission du BVDV d'un animal à l'autre (Roeder et Drew, 1984). Une étude de Houe et Palfi (1993) démontre qu'un animal PI peut infecter plus de 90 % d'un troupeau avant d'atteindre l'âge de 3-4 mois. De plus, ces animaux constituent de véritables réservoirs de mutations génétiques pour le virus, mutations pouvant engendrer des souches plus virulentes et créer de nouvelles épidémies. Une analyse des souches virales contenues dans un animal PI révèle d'importants changements au niveau de la protéine E2 avec le temps (Collins *et al.*, 1999). Selon de récentes estimations, environ 1 à 2 % des animaux sont infectés en persistance (Houe, 1999).



**Figure 2 : Effet du stade de gestation sur le fœtus lors de l'infection d'une vache gestante au BVDV.**

### **1.4.3 Maladie des muqueuses (MD)**

De fortes diarrhées sanguinolentes ainsi que de multiples lésions érosives importantes au niveau des muqueuses du système digestif, respiratoire et urogénital constituent les principaux symptômes de la maladie des muqueuses (MD). Cette maladie, n'atteignant que les veaux PI, provoque également la pyrexie, une hausse de la fréquence respiratoire et cardiaque, une salivation abondante, des écoulements nasaux ainsi qu'une forte diarrhée (Duffell et Harkness, 1985). Ces trois derniers symptômes agissent en synergie pour déshydrater l'animal. Une leucopénie prononcée augmente la probabilité d'infections secondaires. L'animal infecté meurt généralement 1 à 3 semaines suivant l'apparition des symptômes (Baker, 1987), d'où le faible taux de morbidité et le haut taux de mortalité. Deux théories peuvent expliquer l'apparition de la MD. Selon la première, la MD apparaît suite à la surinfection d'un animal PI avec une souche cp antigéniquement homologue à la souche ncp immunotolérée (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985). L'homologie entre les deux souches affecte grandement la sévérité de la maladie (Brownlie, 1991). En effet, l'animal peut souffrir de violents symptômes si la souche cp qui surinfecte l'animal est partiellement homologue. Selon la seconde théorie, la souche ncp devient cp suite à une recombinaison. Des analyses génomiques révélèrent que des insertions et des réarrangements de séquences sont retrouvés dans le génome des pestivirus cp mais non dans l'ARN des virus ncp correspondants (Meyers *et al.*, 1996).

## **1.5 IMPORTANCE ÉCONOMIQUE**

Les effets tératogènes, les infections secondaires et la contamination du sérum de culture cellulaire constituent les principales pertes économiques provoquées par le BVDV. Atteignant plusieurs millions de dollars par année, ces pertes classent le BVDV comme un des agents étiologiques les plus dommageables pour l'industrie bovine.

### ***1.5.1 Pertes reliées à l'infection***

Les principales pertes économiques engendrées par une infection au BVDV relèvent généralement des infections prénatales résultant en des avortements, des morts-nés, des malformations congénitales et des retards de croissance (Duffell *et al.*, 1986). Le remplacement des animaux infectés en persistance et le traitement des infections secondaires avec des antibiotiques occasionnent également des coûts importants. Au Québec, le conseil de recherche des pêches et de l'agro-alimentaire évalue les pertes annuelles à 1,1 millions de dollars pour le remplacement des animaux, à 1,12 millions pour les médicaments et à plus de 5 millions pour les retards de croissance. Selon de récentes estimations par million de gestations, plus de 20 millions de dollars US de pertes proviennent d'infections au BVDV avec des souches peu virulentes alors que les souches virulentes occasionnent plus de 57 millions de dollars US en dommages moyens chez les veaux (Houe, 1999). Et ces dernières estimations ne tiennent compte que des coûts reliés aux infections prénatales! Des pertes moins importantes comportent une diminution de la production de lait, un taux de conception réduit ainsi que des problèmes respiratoires et digestifs (McGowan et Kirkland, 1995; Houe, 1999).

### ***1.5.2 Contamination du sérum bovin dans les cultures cellulaires***

Présent parfois dans le sérum bovin, le BVDV contamine souvent les cultures cellulaires (Bolin *et al.*, 1991b; Potts *et al.*, 1989). La préparation de vaccins atténués dirigés contre d'autres pathogènes par culture cellulaire et son administration peut possiblement transmettre le BVDV (Lohr *et al.*, 1983; Levings et Wessman 1991). Certains manuscrits rapportent le déclenchement d'épidémies suite à la vaccination d'un troupeau (Levings et Wessman, 1991; Wensvoort et Terpstra, 1988). Le transfert d'embryon nécessite également du sérum bovin et représente une autre porte d'entrée pour le BVDV dans un troupeau (Meyling *et al.*, 1990). Les compagnies doivent dépenser temps, matériel et argent afin de s'assurer de l'absence du BVDV dans les lignées cellulaires et le sérum.



## **1.6 BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

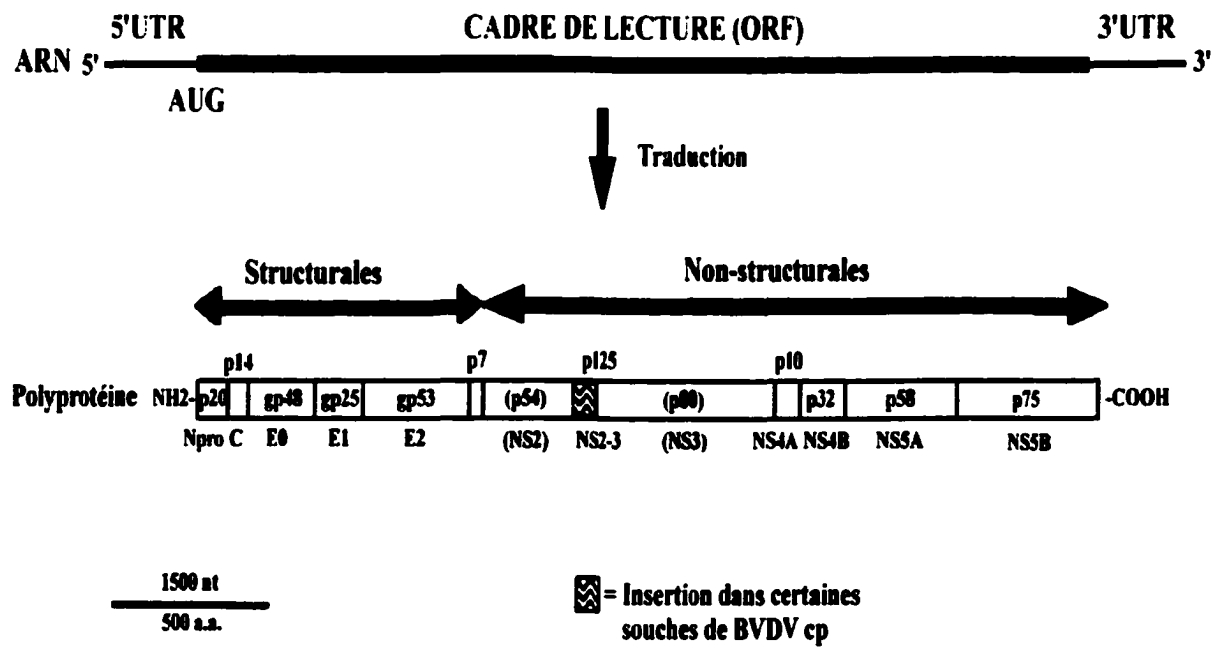
Des avancements importants dans la compréhension de la pathogénèse du BVDV proviennent de la caractérisation moléculaire du virus. Les données recueillies au niveau de l'organisation du génome, de la maturation protéolytique et de l'implication des différentes protéines dans l'infection favorisent la compréhension du mécanisme de réplication et de persistance du virus. Ces connaissances permettront sans doute d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales afin de contrer le BVDV.

### ***1.6.1 Nomenclature***

Afin de comparer les protéines des différentes espèces de pestivirus, une nomenclature fut développée (figure 3). Alors que la lettre E agit comme préfixe pour les protéines de l'enveloppe, c'est NS qui assure le même rôle pour les protéines non-structurales. Dans les deux cas, les lettres sont suivies d'un nombre correspondant à leur ordre d'apparition dans le génome. Les lettres A et B désignent deux protéines provenant du même précurseur lors de la maturation protéolytique. Par exemple, la glycoprotéine gp48 a reçu le nom E0 signifiant qu'il s'agit d'une protéine de l'enveloppe et qu'elle est la première dans l'ordre des nucléotides du génome du BVDV. Les noms Npro et C tiennent pour autoprotéase et capsidie respectivement.

### ***1.6.2 Organisation génomique***

Le BVDV est un virus à ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 12.3 kb contenant un seul cadre de lecture (ORF) codant pour environ 4000 acides aminés (Collett *et al.*, 1988a; Meyers *et al.*, 1989). Son génome comprend des séquences non-traduites (UTR) en 5' et en 3' ainsi que des protéines structurales et non-structurales (figure 3). Le premier tiers de l'ORF code pour les protéines structurales alors que le reste du génome code pour les

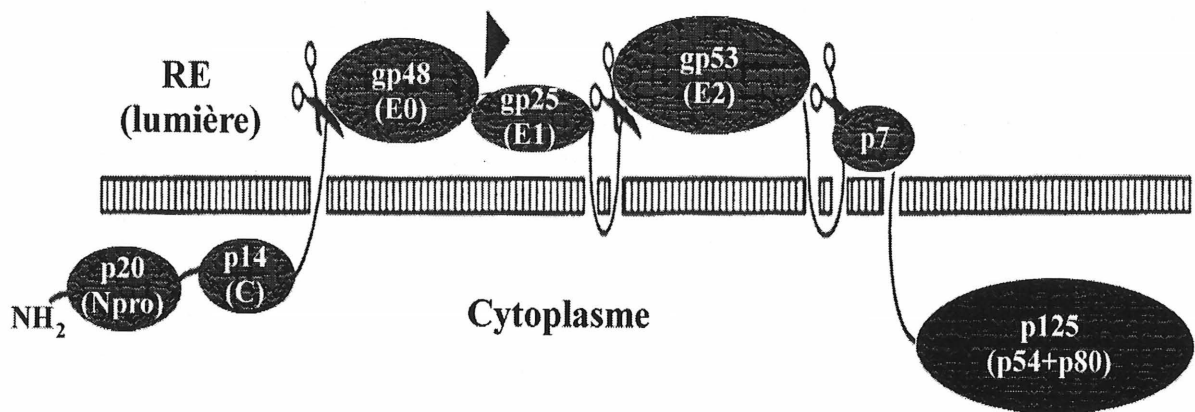


**Figure 3 : Organisation génomique du BVDV.**

protéines non-impliquées dans la structure (Collett *et al.*, 1988b). Les protéines structurales comportent la protéine C (p14) de la capsid et trois glycoprotéines membranaires, soit E0, E1 et E2 (Donis et Dubovi, 1987). Les protéines non-structurales, au nombre minimal de six (Npro , NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B), assurent le bon fonctionnement du mécanisme de réplication. Chez les souches cytopathogènes, on retrouve une protéine additionnelle, soit la p80 (NS3) qui résulte du clivage de la NS2-3 en deux fragments (Collett *et al.*, 1989).

### ***1.6.3 Traduction et maturation protéolytique***

Le 5' UTR de l'ARN<sub>sb</sub> contient un site d'internalisation au ribosome (IRES) permettant l'initiation de la traduction (Poole *et al.*, 1995). La traduction de l'ARN se fait en une seule polyprotéine hypothétique de 440 kDa (Deng et Brock, 1992) subséquentement clivée en divers précurseurs polypeptidiques de façon co- et post-traductionnelle (Collett *et al.*, 1988b) (figure 4). Cette maturation protéolytique dépend de protéases virales et cellulaires. Entre autres, les clivages au niveau des protéines structurales se font par des signalases suite à la translocation partielle de la polyprotéine au niveau du réticulum endoplasmique (RE) grâce à la présence d'une séquence signal située entre p14 (C) et gp48 (E0) (Rümenapf *et al.*, 1993). Deux régions hydrophobes situées en amont de gp53 provoquent une interruption dans le transfert, la première jouant le rôle de signal d'arrêt de transfert de gp25 et la seconde de séquence signal pour gp53 (Rümenapf *et al.*, 1993). La translocation se poursuit jusqu'à la présence d'une région riche en acides aminés hydrophobes qui représente le site d'ancrage à la membrane de gp53 (Van Zijl *et al.*, 1991). En ce qui a trait aux protéines non-structurales, la p20 catalyse son propre clivage en C-terminal tandis que la maturation des autres est assurée par l'activité protéase de la p125 ou la p80.



**Figure 4 : Maturation protéolytique de la polyprotéine du BVDV.**

#### **1.6.4 Protéines du BVDV**

La réplication virale nécessite la présence de protéines structurales et non-structurales. Les protéines structurales, partie intégrante du virion, sont impliquées dans l'attachement et la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule alors que les protéines non-structurales assurent la réplication du virion.

##### **1.6.4.1 Protéines structurales**

Quatre protéines structurales sont retrouvées chez le BVDV. On note la protéine p14 qui joue le rôle de protéine de la capsid, ainsi que gp48, gp25 et gp53 qui correspondent aux glycoprotéines de l'enveloppe. La protéine de la capsid a pour fonction d'empaquer l'ARN génomique viral et fournir une structure pour la formation de l'enveloppe du virion. La protéine gp48 semble importante dans la pathogenèse du virus puisqu'elle possède la capacité d'induire l'apoptose chez les lymphocytes (Brushcke *et al.*, 1997a). Elle favorise ainsi la persistance virale par un affaiblissement du système immunitaire. On lui attribue également une activité RNase (Schneider *et al.*, 1993). Peu d'informations existent au sujet de la gp25 et par conséquent, son rôle reste encore à définir. En ce qui concerne la gp53, cette glycoprotéine virale joue un rôle prépondérant dans la pathogenèse. En effet, son implication dans l'attachement du virus à la membrane cellulaire (Xue et Minocha, 1993) initie l'infection. L'entrée du virus dans la cellule se fait ensuite par endocytose médiée par un récepteur (Boulanger *et al.*, 1993) et il semblerait que ce processus soit appuyé par des interactions entre gp48 et la cellule (Hulst *et al.*, 1994). La gp53 affecte également l'assemblage du virion. Lorsque liée à p7 via son extrémité C-terminale, elle permet la fixation de la protéine p14 et donc de débiter la formation de la capsid, enveloppe protectrice du matériel génétique du virus. Alors que gp25 et gp53 possèdent une séquence d'ancrage à la membrane bilipidique, le mécanisme maintenant gp48 à la surface reste à définir (Rümenapf *et al.*, 1993). Des études portant sur l'arrangement précis des protéines de surface révèlent que des ponts disulfures intermoléculaires rattachent les glycoprotéines entre

elles sous forme d'homodimères (E0-E0; E2-E2) et d'hétérodimères (E2-E1) (Weiland *et al.*, 1990; Wensvoort *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991).

#### **1.6.4.2 Protéines non-structurales**

La protéine p20 possède une activité autoprotéasique capable de cliver son extrémité C-terminale à sa jonction avec la protéine de la capside (Wiskerchen *et al.*, 1991). Toutefois, son rôle exact dans la réplication virale reste inconnu. Une intéressante propriété relève de la protéine p125 (NS2-3). Cette dernière se retrouve scindée en deux protéines, la p54 (NS2) et la p80 (NS3), chez les souches de BVDV cytopathogènes. La p54 possède une extrémité amino-terminale très hydrophobe et un motif doigt de zinc (zinc finger) lui permettant de s'ancrer à la membrane et d'interagir avec l'ARN viral. Sa fonction pourrait consister à maintenir le complexe réplcatif en place et/ou régulariser la réplication elle-même (Collett, 1992). Tant qu'à la p80, il s'agit d'une protéine multifonctionnelle. En effet, des activités nucléoside triphosphatase (Tamura *et al.*, 1993) et hélicase (Warrener et Collett, 1995) lui confère un rôle à jouer dans la réplication de l'ARN. De plus, l'activité sérine-protéase de la p80 permet la maturation protéolytique du reste des protéines non-structurales (Wiskerchen *et al.*, 1991). La p10 (NS4A) et la p32 (NS4B) semblent requises en tant que cofacteurs pour compléter l'activité protéolytique de la p80 (Wiskerchen *et al.*, 1991; Failla *et al.*, 1994). En ce qui a trait à la protéine p133 (NS5), son clivage génère 2 sous-unités, la p58 (NS5A) et la p75 (NS5B). La p75 possède un motif 'Gly-Asp-Asp', présent chez toutes les ARN polymérases virales (Kamer et Argos, 1984), évoquant la possibilité que cette protéine constitue l'ARN polymérase du BVDV (Collett, 1992). Quant à la forme complète, p133, elle pourrait assurer la synthèse des brins négatifs et positifs du BVDV (Collett, 1992).

## **1.7 IMMUNOLOGIE**

Malgré plusieurs années de recherche sur le BVDV, la caractérisation immunologique du virus demeure à l'état embryonnaire. Bien qu'aucun corrélat de protection ne soit établi, quelques données subsistent sur la réponse humorale et cellulaire cytotoxique développée par le bovin lors de l'infection.

### ***1.7.1 Réponse humorale***

En terme de réponse humorale, les bovins peuvent produire des anticorps contre les protéines gp48, gp53 et p125 (Bolin, 1993). Puisque la protéine p125 est intracellulaire, peu d'intérêt réside dans la production d'anticorps dirigés contre cette protéine, sauf comme mesure diagnostique pour l'identification d'animaux étant entré en contact avec le virus. Protéine majeure de l'enveloppe, gp53 constitue la protéine la plus variable et immunodominante des protéines des pestivirus (Toth *et al.*, 1999). Tout comme gp48 (Boulanger *et al.*, 1991; Thiel *et al.*, 1991), elle forme la cible d'anticorps neutralisants (Bolin *et al.*, 1988; Donis *et al.*, 1988; Magar *et al.*, 1988). Toutefois, la localisation exacte et la relation entre les épitopes sur la protéine gp53 demeure nébuleux (Bolin *et al.*, 1988; Collett *et al.*, 1989; Paton *et al.*, 1992). En ce qui concerne le génotype II, des anticorps neutralisant l'infectivité virale semblent dirigés contre trois domaines antigéniques (Deregt *et al.*, 1998b) comparativement à 1 pour les souches de génotype I (Deregt *et al.*, 1998a). Un épitope linéaire existe également dans l'extrémité C-terminale, mais ce dernier n'est pas accessible à la surface du virion (Yu *et al.*, 1996).

### **1.7.2 Réponse cytotoxique**

En 1992, Howard et ses collaborateurs identifièrent une réponse cytotoxique médiée par les cellules T CD4<sup>+</sup> dans la réponse immunitaire de veaux contre le BVDV. Suite à une restimulation *in vitro*, cette réponse CTL fut aussi mise en évidence par Beer et ses collaborateurs (1997) au niveau des cellules mononucléées de sang périphérique chez le bovin. Malheureusement, la cible de la réponse cytotoxique et son implication dans la protection n'ont pas été caractérisées. Comme cible potentielle, la protéine p80 forme un bon candidat puisqu'elle génère une réponse CTL chez la souris (Reddy *et al.*, 1999). Des études chez le CSFV démontre que la p80 de ce virus contient un épitope CTL dans sa portion C-terminale (Pauly *et al.*, 1995). Des alignements de séquences révélèrent que cet épitope est hautement conservé chez tous les pestivirus. Toutefois, aucune connaissance ne subsiste sur la contribution de ce dernier dans la réponse immunitaire protectrice. Chez les flavivirus et le virus de l'hépatite C, les deux autres genres de la famille *Flaviviridae*, la protéine p80 comporte également des épitopes CTL (Lobigs *et al.*, 1994). En se basant sur les motifs peptidiques et clivages protéolytiques propres au MHC I du bovin, Hegde et Srikumaran (1997) ont prédit les épitopes CTL potentiels pour le BVDV. Cette publication pourrait diminuer significativement le travail à accomplir afin de déterminer certains épitopes cytotoxiques chez le BVDV. Une caractérisation immunologique plus poussée du virus aiderait énormément à l'élaboration de stratégies de vaccination plus efficaces.

## **1.8 PRÉVENTION ET CONTRÔLE DES INFECTIONS AU BVDV**

Les méthodes prophylactiques actuelles visant à contrôler le BVDV se concentrent sur l'identification et le retrait de bovins infectés en persistance ainsi que la vaccination. Cette dernière mesure constitue la mesure préventive la plus efficace afin de promouvoir la santé animale (van Oirschot *et al.*, 1999).



### ***1.8.1 Retrait des animaux infectés en persistance***

L'apparition du BVDV au sein d'un troupeau se fait typiquement par l'addition de nouvelles bêtes. Quelquefois, ces nouveaux bovins font l'objet d'infections aiguës ou persistantes avec le virus et peuvent le transmettre aux autres membres de la communauté bovine. Afin de limiter l'introduction du virus dans le cheptel, de simples mesures de gestion du bétail peuvent être appliquées. Par exemple, la mise en quarantaine des nouvelles bêtes devrait être faite jusqu'à l'obtention des résultats des tests diagnostiques. Alors que les animaux non-infectés peuvent être amendés au reste du troupeau, ceux infectés doivent être traités. Les bovins infectés en persistance, principaux vecteurs de transmission et du maintien du BVDV dans un troupeau, doivent être éliminés pour contrôler les infections.

### ***1.8.2 Vaccination***

Une infection au BVDV lors de la gestation peut se traduire par plusieurs conséquences sévères. Outre les malformations congénitales, les infections transplacentaires peuvent donner naissance à des veaux infectés en persistance. C'est pourquoi la vaccination actuelle contre le BVDV se concentre sur la prévention des infections foetales. Trois points importants se doivent d'être adressés en ce qui concerne les vaccins contre le BVDV. On note le niveau de protection placentaire, la durée de l'immunité protectrice suite à la vaccination ainsi que le niveau de protection généré par le vaccin contre les deux géotypes viraux. Les vaccins conventionnels et recombinants constituent les deux principaux types de vaccins actuels pour combattre le BVDV.

### **1.8.2.1 Vaccins conventionnels**

Afin de contrer le BVDV, plusieurs vaccins conventionnels font l'objet de commercialisation. On en retrouve plus de 140 qui possèdent une licence aux États-Unis (Bolin, 1995). Malgré leur utilisation étendue, ces vaccins causent une panoplie de réactions secondaires et leur utilisation s'avère peu efficace ou dangereuse (Bolin et Ridpath, 1996). On en retrouve deux types, soit les vaccins inactivés et les vaccins atténués.

#### ***1.8.2.1.1 Vaccins inactivés***

Les vaccins inactivés sont constitués de particules virales inactivées par traitement chimique. Le traitement chimique modifie la structure du virus et par le fait même, détruit son pouvoir infectieux. La destruction de l'infectivité empêche pratiquement toute réversion possible ainsi que la recombinaison génétique (Baker, 1995). Comme les virus inactivés ne possèdent plus la propriété d'infecter les cellules de l'animal vacciné, ce type de vaccin s'avère idéal pour la vaccination de vaches gestantes. De plus, l'administration d'un vaccin inactivé ne semble pas causer d'immunosuppression ni altérer la population de lymphocytes (Ellis *et al.*, 1988; Larsson et Fossum, 1992). Toutefois, afin de générer une réponse immunitaire protectrice, un minimum de deux doses est nécessaire, augmentant ainsi le coût et le temps requis pour établir la protection. De plus, l'immunité générée est de courte durée tel que démontré par l'absence d'anticorps neutralisants moins d'un an après la vaccination (Bolin *et al.*, 1991a). La combinaison d'un vaccin inactivé et d'adjuvants pour amplifier la réponse immunitaire contre ces vaccins peut également provoquer une réaction inflammatoire et anaphylactique au site d'inoculation.

Deux études relevant de la vaccination avec un vaccin inactivé méritent une certaine attention. Entre autres, l'injection d'un vaccin inactivé composé de trois souches différentes de BVDV génère une protection complète contre un challenge viral avec une souche homologue chez les veaux (Howard *et al.*, 1994). Toutefois, on ne sait pas si ce vaccin

confère une protection contre des souches hétérologues. Comme les vaccins inactivés génèrent une réponse immunitaire au niveau des cellules T CD4<sup>+</sup> (endocytose des particules virales et présentation par les cellules via le CHM II) et que la variation antigénique du BVDV au niveau des protéines membranaires est considérable, il est peu probable que ce vaccin puisse conférer une protection contre un challenge avec des souches de génotype II. En ce qui a trait à la prévention des infections intra-utérines, une seule publication fait mention de protection foetale avec un vaccin inactivé (Brownlie *et al.*, 1995). Il s'agit d'un vaccin ne contenant qu'une seule souche conférant une protection homologue relativement courte. Afin de déterminer le spectre de protection que confère ce vaccin, des challenges devront être faits avec différentes souches de BVDV.

#### *1.8.2.1.2 Vaccins atténués*

Composés de souches virales atténuées par de multiples passages sur culture cellulaire, les vaccins atténués peuvent se répliquer au niveau de l'hôte. Puisque la réplication du virus permet l'amplification de l'antigène *in vivo*, seul un nombre limité de particules s'avère nécessaire pour l'immunisation. Ces vaccins provoquent une réponse immunitaire rapide caractérisée par l'apparition d'anticorps neutralisants contre une grande diversité de souches de BVDV seulement trois semaines suite à l'administration du vaccin (Bolin et Ridpath, 1989). Ces immunoglobulines persistent en haute concentration pour plus d'un an après la vaccination sans besoin de rappels (Coria et McClurkin, 1978). Malgré la génération d'une réponse immune rapide et efficace, les vaccins atténués possèdent de multiples désavantages. En outre, comme le virus peut traverser la barrière placentaire, des dommages irréversibles tels la mort foetale et des effets tératogènes peuvent subvenir lors de la vaccination de vaches gestantes. De plus, l'immunisation avec ce type de vaccin peut causer la MD chez les animaux PI, par recombinaison du virus, et même la stérilité du bovin (Bolin, 1995).

Parmi les réussites au niveau de la vaccination avec des souches de BVDV atténuées, on note un vaccin combinatoire comprenant plusieurs virus différents. Ce vaccin, composé de la souche BVDV I NADL, du virus de l'herpes bovin, du virus parainfluenza-3 ainsi que du virus syncytial respiratoire, protège les bovins suite à un challenge avec une souche de BVDV de génotype II (Cortese *et al.*, 1996). Vu la variété antigénique énorme au niveau des protéines de surface entre les génotypes I et II du virus, ces résultats soulèvent le fait que l'immunité à médiation cellulaire doit être importante afin de contrôler les infections au BVDV. De plus, même si le BVDV est souvent impliqué dans la pathogenèse de maladies respiratoires, il ne semble pas induire la maladie par lui-même (van Oirschot *et al.*, 1999). Par contre, il peut supprimer le système immunitaire de l'hôte, ouvrant ainsi la voie à d'autres microorganismes dans l'induction de maladies respiratoires et entériques, d'où l'intérêt de covacciner avec des pathogènes opportunistes.

Alors que les vaccins inactivés offrent la sécurité, l'immunité qu'ils confèrent est déficiente, de très courte durée et ne protège pas contre des souches de BVDV hétérologues. Quant aux vaccins atténués, malgré qu'ils donnent un bon niveau de protection, ils sont inappropriés pour la vaccination de vaches gestantes ou d'animaux faisant partie d'un troupeau contenant des vaches gestantes. Les caractéristiques intrinsèques des vaccins conventionnels sont résumées dans le tableau 1. L'incapacité des vaccins conventionnels de générer une immunité protectrice appropriée de manière sécuritaire pousse les chercheurs à se tourner vers le développement de vaccins recombinants afin de prévenir les infections au BVDV.

#### **1.8.2.2 Vaccins recombinants**

La naissance des vaccins recombinants provient d'une augmentation des connaissances en immunologie, biologie cellulaire et biologie moléculaire. On en retrouve présentement trois types, soit les vaccins à sous-unités, les vecteurs viraux ainsi que l'immunisation à l'ADN.

**Tableau 1: Caractéristiques des vaccins conventionnels contre le BVDV.**

	<b>Vaccin inactivé</b>	<b>Vaccin atténué</b>
<b>Protection</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moyenne</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Très bonne</li> </ul>
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécuritaire pour les vaches gestantes.</li> <li>• Pas de risque de réversion à la virulence.</li> <li>• Contamination par d'autres virus peu probable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Économique</li> <li>• Pas besoin de rappel (boost)</li> <li>• Réponse immunitaire rapide après la vaccination et de plus longue durée.</li> <li>• Protection antigénique couvre un spectre plus large.</li> </ul>
<b>Désavantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coût élevé.</li> <li>• Besoin de rappels fréquents (boost).</li> <li>• Induction de l'immunité lente.</li> <li>• Immunité de courte durée.</li> <li>• Spectre de protection plus limité.</li> <li>• Réaction au site d'injection.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potentiel de contamination avec d'autres virus.</li> <li>• Possibilité d'induire la MD.</li> <li>• Immunosuppression passagère.</li> <li>• Atteinte du fœtus si administré à une vache gestante (Liess <i>et al.</i>, 1984).</li> <li>• Doit maintenir les vaches en gestation à l'écart des animaux vaccinés.</li> </ul>

#### **1.8.2.2.1 Vaccins à sous-unités**

Grâce au génie génétique, un gène d'intérêt immunologique peut être cloné dans un vecteur, exprimé dans un système cellulaire et purifié par la suite. Chez le BVDV, la protéine gp53 constitue la protéine immunodominante et génère la production d'anticorps neutralisants (Bolin *et al.*, 1988; Donis et Dubovi, 1988; Magar *et al.*, 1988). Elle constitue donc la cible de choix pour la production de protéines recombinantes destinées à l'injection pour la génération d'une réponse humorale protectrice.

Lorsque injectée comme composante d'un vaccin à sous-unité chez le bovin et le mouton, la protéine gp53 démontre différents niveaux de protection contre la maladie. Dans l'étude de Bolin et Ridpath (1996), l'injection de la protéine recombinante induit seulement une protection limitée chez les veaux vaccinés. Cette protection partielle en ce qui a trait à un challenge homologue (Singer), se révélait nulle contre un challenge hétérologue (890). De récents rapports indiquent que le BVDV 890 diffère génotypiquement et antigéniquement de la souche Singer (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). Dans une autre expérience, la vaccination de moutons avec la protéine gp53 recombinante génère une protection foetale suite à un challenge avec une souche de BVDV homologue (Bruschke *et al.*, 1997b). Toutefois, cette protection ne couvre qu'un faible spectre de la diversité antigénique du BVDV. Afin de couvrir la majorité des variants antigéniques, quatre sous-unités de différents génotypes dont Ia, Ib et II, ont été injectés à des veaux (Bruschke *et al.*, 1999). Malgré la présence d'anticorps neutralisants contre tous les variants injectés, le vaccin confère seulement une protection partielle puisqu'il ne contre pas la réplication virale *in vivo*.

#### **1.8.2.2.2 Vecteurs viraux**

Les vecteurs viraux tels l'adénovirus, le virus de la vaccine ainsi que toute la famille des poxvirus forment une classe de vaccins recombinants permettant de produire les protéines à l'intérieur des cellules de l'organisme. La génération d'une réponse cytotoxique

est donc possible via la présentation par le CMH I. L'utilisation de telles constructions dans la vaccination contre le BVDV est encore au stade de développement. La majeure partie des études concernant le BVDV employant des vecteurs viraux ciblent la protéine gp53. Mis à part gp53, deux récents rapports traitent de la réponse immunitaire contre les protéines de la capside et p80. Aucune publication ne fait état de protection en ce qui concerne la vaccination avec des vecteurs viraux contre le BVDV.

L'utilisation du virus de la vaccine codant pour la protéine gp53 pour l'immunisation de souris génère la production d'anticorps neutralisants (Toth *et al.*, 1999). Ces anticorps ne neutralisent que des souches homologues du BVDV (NADL (Ia) et OregonC24 (Ia) mais non la souche hétérologue Osloss (Ib)). Des tests chez les moutons gnotobiotiques corréleront les résultats obtenus chez la souris en terme de neutralisation. On peut constater une différence dans la réactivité croisée de certains anticorps neutralisants par rapport à l'étude similaire faite avec des sous-unités par Bolin et Ridpath (1996). Cela suggère une différence au niveau de la conformation des épitopes lorsque la protéine est synthétisée à l'intérieur de la cellule comparativement à son injection suite à la production de gp53 dans des cellules d'insectes. Une autre étude faite chez la souris avec un adénovirus recombinant codant pour la protéine gp53 du BVDV note la production d'anticorps neutralisants et d'une immunité à médiation cellulaire, caractérisée par la production d'interféron- $\gamma$ , suite à l'injection du virus recombinant (Elahi *et al.*, 1999c). Également chez la souris, des résultats similaires furent obtenus en employant un vecteur fowlpox codant pour gp53 (Elahi *et al.*, 1999b).

La caractérisation de la réponse immunitaire contre la protéine p14 de la capside et p80 codées par des adénovirus, indique que chaque protéine provoque la production d'anticorps non-neutralisants (Elahi *et al.*, 1999d; Elahi *et al.*, 1999a). De plus, la protéine de la capside induit une réponse lymphoproliférative contre les deux génotypes de virus (I et II) alors qu'une immunité à médiation cellulaire caractérisée par la production d'IFN- $\gamma$  survient suite à l'injection de p80 (Elahi *et al.*, 1999d; Elahi *et al.*, 1999a). La question à savoir si

l'immunité cellulaire engendrée par ces deux constructions confère une protection, demeure un mystère.

#### *1.8.2.2.3 Immunisation à l'ADN*

Le clonage d'une protéine immunogénique dans un vecteur permet l'expression de cette dernière dans les tissus de l'hôte suite à l'injection de la construction d'ADN. Tout comme les vecteurs recombinants, l'immunisation à l'ADN permet la synthèse de l'immunogène à l'intérieur des cellules et donc la possibilité qu'une réponse immunitaire cytotoxique soit produite. Seulement trois publications notent l'utilisation de cette nouvelle technologie.

L'injection d'un plasmide codant pour la protéine gp53 induit la production d'anticorps neutralisant l'infectivité virale chez la souris (Harpin *et al.*, 1997). Cette neutralisation se fait seulement contre des souches homologues au gène cloné dans le vecteur et les anticorps persistent pour plus de 6 mois chez l'animal. Une protection partielle, caractérisée par la production d'anticorps neutralisants et une immunité à médiation cellulaire, contre un challenge homologue s'observe chez le bovin lors d'immunisations utilisant cette construction (Harpin *et al.*, 1999). Une étude chez la souris soulève un grand intérêt puisqu'une réponse CTL est observée contre la protéine p80 (Reddy *et al.*, 1999). Toutefois, ces résultats et le rôle potentiel de cette réponse dans la protection chez le bovin restent à confirmer.

Le plus grand obstacle à la vaccination contre le BVDV repose dans la variation antigénique du virus. Le besoin d'inclure une panoplie de souches hétérologues afin d'assurer une protection à large spectre rend la vaccination contre le BVDV difficile. Malgré leur utilisation commerciale fort répandue, les vaccins conventionnels n'ont pas réussi à contenir le BVDV de façon sécuritaire. C'est pourquoi les chercheurs se tournent maintenant



vers les vaccins recombinants, spécialement ceux capables de générer une réponse cytotoxique, comme l'immunisation à l'ADN.

## **B) IMMUNISATION À L'ADN**

### **1.9 POURQUOI VACCINER À L'ADN ?**

Alors que de nouveaux pathogènes comme le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) continuent de s'étendre en proportion épidémique dans plusieurs parties du monde, des maladies telles la malaria et la tuberculose affectent toujours des milliers de personnes chaque année. Malgré l'existence de thérapies efficaces pour la majorité des maladies, le coût exorbitant qu'elles engendrent rend leur étendue d'application limitée, surtout dans les pays en voie de développement. Pour cette raison, la technique la plus puissante afin de contrôler les infections demeure la vaccination prophylactique.

Utilisant des organismes atténués ou inactivés, les vaccins traditionnels permettent de remédier à plusieurs types d'infections. En outre, on observe des diminutions de plus de 99% du nombre de cas de diphtérie, de rougeole et de poliomyélite suite à la vaccination (McDonnell et Askari, 1997). Toutefois, pour cause de sécurité ou de réponse immunitaire déficiente, plusieurs pathogènes ne possèdent pas de vaccins satisfaisants. Par conséquent, de nouvelles approches de vaccination se doivent d'être développées pour contrôler ces maladies. Une de ces nouvelles approches se nomme la vaccination à l'ADN.

### **1.10 HISTORIQUE**

En utilisant l'injection intramusculaire d'ADN plasmidique purifié codant pour la  $\beta$ -galactosidase, Wolff et ses collaborateurs ont démontré l'expression du gène rapporteur dans

le muscle squelettique et l'activité de l'enzyme encodée pour plus de 60 jours après l'inoculation (Wolff *et al.*, 1990). Ce transfert direct de gènes *in vivo* a ouvert la porte toute grande pour l'utilisation de cette méthode pour le remplacement de gènes (thérapie génique) et la vaccination (immunisation à l'ADN). Le pouvoir immunologique de cette technologie fut mis en évidence deux ans plus tard, lorsque l'injection de souris avec un plasmide codant pour l'hormone de croissance humaine provoqua le développement d'une réponse humorale spécifique contre la protéine (Tang *et al.*, 1992). En 1993, le groupe du Dr. Liu démontra que la vaccination à l'ADN peut induire une immunité protectrice contre le virus de l'influenza (Ulmer *et al.*, 1993). Des souris immunisées avec un plasmide codant pour le gène conservé de la nucléoprotéine (NP) du virus de l'influenza développaient de fortes réponses CTL spécifiques leur conférant une protection contre un challenge avec une souche hétérologue. Ces études pionnières annoncèrent une nouvelle ère immunoprophylactique, nommée la troisième génération de vaccins par Waine et McManus (1995).

## **1.11 PRINCIPE**

Le principe de la vaccination à l'ADN étonne par sa simplicité. Tout d'abord, un gène d'intérêt immunologique est cloné dans un vecteur sous le contrôle d'un promoteur eucaryote. Suite à la production de l'ADN plasmidique en bactérie, le plasmide est purifié et injecté à un organisme. L'acquisition de la construction par les cellules de l'organisme inoculé permet la transcription et la traduction de la protéine encodée par le vecteur. Cette dernière est alors processée et présentée au système immunitaire dans un contexte CMH-dépendant. Une réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique contre l'antigène néosynthétisé s'ensuit. Cette réponse est souvent protectrice et de longue durée sans besoin de rappel d'immunisation. Les propriétés intrinsèques de cette technologie lui confère de profondes implications dans les stratégies pour le traitement et la prévention de maladies infectieuses, le cancer, l'autoimmunité et les allergies.

## **1.12 COMPARAISON DES MÉTHODES DE VACCINATION**

Possédant plusieurs avantages sur les stratégies de vaccination courantes, la vaccination à l'ADN semble incorporer la majorité des possibilités les plus attirantes des autres approches modernes (tableau 2). L'avantage le plus évident semble la stabilité chimique et la simplicité de production de l'ADN plasmidique. Ces propriétés faciliteraient la production rapide et à grande échelle de nouveaux vaccins. Les vaccins à l'ADN devraient être moins dispendieux à produire (purification simple) et à administrer que la majorité des alternatives courantes dont les protéines et les vecteurs recombinants. Par exemple, leur utilisation sur le terrain ne nécessiterait pas le besoin de développer des chaînes de systèmes de réfrigération, ce qui mènerait à des économies substantielles compte tenu que les coûts administratifs peuvent représenter plus de 80 % des dépenses courantes impliquées dans l'injection d'un vaccin (Roman *et al.*, 1997). La combinaison potentielle de gènes pour la vaccination génétique limiterait le nombre d'immunisations requises et par conséquent, diminuerait encore les coûts de vaccination. Les gènes inoculés peuvent dériver soit de différents microorganismes, de plusieurs gènes du même microorganisme ou du même gène de plusieurs souches du même pathogène.

Contrairement aux vaccins atténués qui peuvent être immunosuppresseurs (Harland *et al.*, 1992) et réverter en une forme plus virulente par recombinaison comme les vecteurs recombinants, la vaccination à l'ADN est préférable pour les femmes enceintes et les patients immunocompromis puisque le vecteur ne code pas pour une séquence infectieuse (Giese, 1998). Cette technologie peut également s'avérer utile dans la vaccination des nouveau-nés possédant des anticorps maternels qui diminuent l'efficacité des vaccins atténués ou des virus recombinants par neutralisation, prévenant ainsi la réplication du vaccin atténué et la production de l'antigène par le vecteur recombinant. Ces anticorps ne sont pas reconnus par le vecteur d'acides nucléiques, et par conséquent la synthèse de la protéine encodée peut se faire normalement et induire une réponse immunitaire.

**Tableau 2 : Comparaison des vaccins à l'ADN avec les différents types de vaccins existant.**

<i>Propriétés</i>	<b>Types de Vaccins</b>				
	<b>Vaccins Traditionnels</b>		<b>Vaccins Recombinants</b>		
	Vaccins inactivés	Vaccins atténués	Sous-unités protéiques	Vecteurs recombinants	Vaccins à l'ADN
Stabilité	instable, nécessite réfrigération	instable, nécessite réfrigération	instable, nécessite réfrigération	instable, nécessite réfrigération	très stable
Coût de production	faible	variable	élevé : purification	élevé : purification	faible
Coût de développement	faible	faible	élevé	élevé	élevé
Utilisation d'adjuvants	nécessaire	non	nécessaire	non	non
Sécurité	sécuritaire	dangereux	sécuritaire	danger limité	sécuritaire
Protection immunitaire	anticorps	anticorps CTL	anticorps	anticorps CTL	anticorps CTL
Immunité contre le vecteur	non	non	non	anticorps	non
Vaccination néonatale	non	non	non	non	applicable
Combinaisons de maladies	impossible : compétition antigénique	impossible	non : compétition antigénique	limitées	multiples combines

La vaccination à l'ADN permet l'obtention de réponses humorales et cellulaires. La synthèse *de novo* de l'antigène facilite l'expression de l'antigène dans sa forme native, optimisant ainsi la maturation et la présentation de l'antigène. Contrastant avec ceci, les protéines synthétisées dans des systèmes d'expression recombinants *in vitro* peuvent avoir des modifications post-traductionnelles alternatives et les pathogènes inactivés possèdent souvent des cross-link protéiques à leur surface (Donnelly *et al.*, 1997b). Ces deux derniers systèmes peuvent mener à une production d'anticorps de mauvaise spécificité ou à l'abolition de la réponse humorale par rapport à l'immunisation à l'ADN. De plus, la synthèse protéique endogène permet l'induction d'une réponse CTL via la présentation par le CMH I.

La vaccination à l'ADN offre l'opportunité unique de manipuler l'antigénicité de la protéine au niveau du cDNA sans avoir besoin de produire et purifier l'antigène. Lorsque coadministré avec des plasmides codant pour des cytokines ou des molécules costimulatrices, elle permet également de moduler la réponse immunitaire contre l'antigène.

### **1.13 COMPOSITION DU VECTEUR**

Les vecteurs utilisés pour la vaccination à l'ADN partagent certaines caractéristiques avec ceux développés pour l'expression de gènes dans des lignées cellulaires transfectées (Donnelly *et al.*, 1997a). Entre autres, on y retrouve un site de clonage multiple pour l'insertion d'un gène d'intérêt. L'expression de ce gène est assurée par un promoteur ainsi qu'une séquence de polyadénylation et de terminaison de la transcription. De plus, un gène de résistance à un antibiotique (Ex. : ampicilline, kanamycine, néomycine) et une origine de réplication (Ex. : ColE1) permettent respectivement de conférer une croissance sélective et d'obtenir des rendements plasmidiques élevés dans *E. coli*.

## **1.14 PROCESSING ET PRÉSENTATION DE L'ANTIGÈNE**

Suite à l'injection de plasmides dans un organisme, l'ADN entre dans les cellules par un processus d'endocytose médié par récepteur (Hefeneider *et al.*, 1992). Une fois transfectées, les cellules entament l'expression du gène encodé par le vecteur. Afin d'initier une réponse cytotoxique (CTL) ou humorale, l'antigène est alors traité et présenté au système immunitaire via les CHM de classe I et II.

### ***1.14.1 Initiation d'une réponse CTL médiée par les CD8<sup>+</sup>***

L'initiation d'une réponse CTL requiert deux signaux, un conféré par la reconnaissance d'un peptide approprié lié au CMH I à la surface cellulaire et le second par un signal de costimulation non-spécifique (Schwartz, 1992). La présentation d'un antigène par une cellule autre qu'un APC manquant de capacité de costimulation tend à induire la tolérance (Mueller *et al.*, 1989). Malgré que les myocytes (muscle) et les kératinocytes (derme) forment les types cellulaires les plus transfectés lors de l'immunisation à l'ADN (Wolff *et al.*, 1990; Eisenbraun *et al.*, 1993; Raz *et al.*, 1994), ce sont les APC qui initient la réponse CTL lors de la vaccination à l'ADN (Corr *et al.*, 1996; Doe *et al.*, 1996; Iwasaki *et al.*, 1997b). Des évidences suggèrent que l'antigène présenté aux cellules CD8<sup>+</sup> CTL par les APC peut provenir à la fois de la transfection directe des APC et de la capture de l'antigène des APC aux dépens des myocytes ou kératinocytes par un mécanisme de cross-priming (Feltquake, 1998).

### ***1.14.2 Initiation d'une réponse T CD4<sup>+</sup>***

La majorité des cellules T CD4<sup>+</sup>, responsables en partie de l'induction de la réponse humorale, reconnaissent des peptides dérivés de protéines exogènes capturées par endocytose par les APC, dégradées en fragments peptidiques et présentées à la surface cellulaire en

association avec le CMH II (Raz, 1997). L'antigène peut provenir soit de la sécrétion de la protéine des cellules non-lymphoïdes (myocytes et kératinocytes), de la relâche de cette dernière suite à la destruction des myocytes par la réponse CTL ou encore de la transfection directe des cellules présentatrices. Les protéines relâchées sont captées par les cellules présentatrices, dont les lymphocytes B, et présenté via le CMH II aux cellules T pour initier la réponse humorale.

## **1.15 RÉPONSE IMMUNITAIRE GÉNÉRÉE PAR VACCINATION GÉNÉTIQUE**

L'inoculation d'ADN plasmidique dans des souris induit une immunité humorale et cellulaire de longue durée, tel que démontré avec la nucléprotéine (NP) et l'hémagglutinine (HA) de l'influenza (Yanckaukas *et al.*, 1993; Justewicz *et al.*, 1995), l'antigène de surface de l'hépatite B (Davis *et al.*, 1996) ainsi que la protéine C du virus de l'hépatite C (Geissler *et al.*, 1997).

### **1.15.1 Réponse humorale**

La vaccination à l'ADN s'avère une technique efficace afin de générer une réponse humorale. Elle permet l'expression de l'antigène à l'intérieur des cellules, ce qui favorise la formation de la structure native de la protéine en gardant intacts les épitopes conformationnels. De cette façon, il est possible d'obtenir des anticorps neutralisants contre plusieurs types de virus comme le HIV (Wang *et al.*, 1993), le virus de l'influenza (Ulmer *et al.*, 1993) et le virus de l'herpes simplex (Manickan *et al.*, 1995). Malgré que des anticorps peuvent être détectés aussitôt qu'une semaine après l'injection (Davis *et al.*, 1993), la cinétique de production des anticorps est relativement lente. En effet, les titres d'anticorps n'atteignent un maximum que 10 à 12 semaines après l'immunisation (Kowalczyk et Ertl, 1999). Cette lenteur provient probablement du faible taux d'expression protéique suite à la vaccination à l'ADN qui se situe dans l'ordre des ng et pg. Cette hypothèse est corroborée

par la dose d'ADN injectée (Kowalczyk et Ertl, 1999). Plus on injecte d'ADN, plus on accélère la cinétique de production des anticorps puisqu'on augmente le taux d'expression. Toutefois, seule la cinétique change, le titre final reste équivalent. Ces titres persistent à des niveaux élevés pour plusieurs mois.

L'expression prolongée de l'antigène en faible quantité par vaccination génétique stimule le développement de réponses humores plus spécifiques en permettant une maturation sélective des anticorps de plus forte avidité et affinité. Les anticorps induits par la vaccination à l'ADN sont généralement des IgG, mais des IgA et IgM ont également été notés (Justewicz *et al.*, 1995; Deck *et al.*, 1997).

### **1.15.2 Réponse cellulaire**

L'immunité à médiation cellulaire des cellules T comporte deux principaux embranchements : il y a les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires, qui apportent de l'aide aux autres cellules, et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui éliminent les cellules infectées de pathogènes. Par sa production de protéines à l'intérieur des cellules, la vaccination à l'ADN permet la génération de ces deux embranchements de l'immunité à médiation cellulaire.

#### **1.15.2.1 Réponse T auxiliaire**

Le processing et la présentation de peptides provenant de protéines exogènes ou endogènes par les APC aux cellules T auxiliaires (Th ou T CD4<sup>+</sup>) via le CMH II permet l'activation de ces dernières. Une fois activées, les fonctions effectrices des cellules Th sont accomplies par le biais d'interactions cellule-cellule et la sécrétion de médiateurs protéiques dont les cytokines. Ces moyens permettent aux cellules Th de donner de l'aide aux autres cellules du système immunitaire, dont les macrophages ainsi que les lymphocytes B et T.



Cette entraide se traduit par la promotion de la différenciation et du développement de l'immunité effectrice et mémoire. Selon les cytokines qu'ils produisent, les lymphocytes Th se divisent en trois sous-groupes, soit Th0, Th1 et Th2. Les cellules Th0 ne sont pas différenciées et sécrètent de l'IL-2. Les cellules Th1 produisent de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  afin de supporter le développement de l'immunité à médiation cellulaire. En plus de promouvoir l'activation des macrophages et des cellules T cytotoxiques, l'IFN- $\gamma$  permet d'activer les cellules B à sécréter l'isotype IgG2a. En ce qui concerne les cellules Th2, elles supportent le développement de l'immunité humorale par la production d'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10. Ces cytokines activent les éosinophiles et déclenchent la production d'IgG1 et d'IgE par les cellules B (Abbas *et al.*, 1997). Les réponses Th1 et Th2 s'excluent mutuellement et sont réciproquement régulées par les cytokines qu'elles sécrètent *in vivo*. L'IFN- $\gamma$  inhibe le développement de la réponse Th2 alors que l'interleukine 10 affecte à la baisse le développement de la réponse Th1. Par ses motifs immunostimulateurs contenus dans le vecteur d'ADN bactérien, l'immunisation à l'ADN induit une réponse de type Th1 et favorise donc par le fait même l'immunité à médiation cellulaire. Le type de réponse Th généré par un vaccin s'avère un des facteurs déterminants dans la vaccination. Par exemple, le développement d'une réponse Th2 contre une infection avec *Leishmania* s'avère fatale alors qu'une réponse de type Th1 confère la protection (Heinzel, 1995).

#### **1.15.2.2 Réponse cytotoxique**

La synthèse de l'antigène à l'intérieur des cellules à partir du vecteur rend l'immunisation à l'ADN particulièrement utile pour l'induction d'une réponse cytotoxique médiée par les cellules T. Dans le cytoplasme, une fraction de l'antigène est dégradée par le protéasome en peptides. La translocation de ces peptides au RE permet leur association au CMH I et leur transport à la surface cellulaire pour la présentation aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Seuls les fragments possédant une bonne affinité avec le CMH I seront présentés efficacement (épitopes immunodominants) afin d'induire une réponse cytotoxique. Plusieurs

antigènes démontrent la production d'une activité CTL suite à la vaccination à l'ADN. Par exemple, on note la NP du virus de l'influenza (Ulmer *et al.*, 1993) ainsi que les protéines de l'enveloppe (*env*) et gp160 du HIV (Okuda *et al.*, 1995; Shiver *et al.*, 1995). Dans certains systèmes expérimentaux, l'activité CTL peut être détectée aussitôt que 3-6 jours après l'injection alors que la réponse maximale est atteinte environ 12 jours après l'immunisation et maintenue pendant plusieurs mois (Ramsay *et al.*, 1997). L'importance de cette réponse réside dans l'élimination des pathogènes intracellulaires (Ex. virus et parasites) et dans la protection contre plusieurs maladies.

## **1.16 EFFET D'ADJUVANT DE L'ADN**

Comment se fait-il que la production de minimes quantités de protéines par les cellules transfectées *in vivo*, de l'ordre du pg au ng/mL (Raz, 1997), occasionne de si fortes réponses immunitaires ? Une explication plausible provient de récentes données concernant l'ADN plasmidique. Conceptuellement, un plasmide peut se séparer en deux unités distinctes. Il y a l'unité transcriptionnelle qui dirige la synthèse de l'antigène et l'unité séquentielle de nucléotides du vecteur qui possèdent des motifs ayant un effet immunostimulateur. La majorité des gènes bactériens possèdent des motifs CpG non-méthylés contenus à l'intérieur d'une séquence palindromique hexamérique suivant la formule 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine (Yamamoto *et al.*, 1992). Ces motifs induisent la prolifération des cellules B et la production d'immunoglobulines (Krieg *et al.*, 1995; Klinman *et al.*, 1996; Messina *et al.*, 1991). De plus, ils provoquent la sécrétion de plusieurs cytokines, dont l'IFN- $\alpha$  et  $\beta$  (Brinkman *et al.*, 1993; Xiang et Ertl, 1995), l'IL-6 (Krieg *et al.*, 1995; Klinman *et al.*, 1996), l'IL-12 (Trinchieri, 1995) et l'IL-18 (Okamura *et al.*, 1995), par les cellules engagées dans la présentation de l'antigène. Ces médiateurs déclenchent tous la production d'IFN- $\gamma$  (par les cellules NK et les macrophages) et par conséquent, favorisent la différenciation des cellules T naïves et lymphocytes Th1. Donc, les motifs CpG non-méthylés contenus dans l'ADN plasmidique entraînent majoritairement la

génération de réponses à médiation cellulaire. Puisque la méthylation abolit l'effet immunostimulateur des motifs CpG (Krieg *et al.*, 1995), la présence de telles séquences chez les vertébrés ne stimule pas la production de cytokines, compte tenu que ces motifs sans méthylation sont vingt fois moins communs chez les eucaryotes que chez les procaryotes (Klinman *et al.*, 1996). La séquence précise et la localisation de ces motifs affectent la réponse immunitaire engendrée puisqu'ils ne stimulent pas le système de façon équivalente (Sato *et al.*, 1996).

## **1.17 PROTECTION CONTRE LES MALADIES VIRALES**

Plusieurs modèles animaux utilisés dans l'évaluation des vaccins pour l'homme soulèvent une immunité protectrice suite à la vaccination à l'ADN. Parmi ces modèles, on note des cas de protection contre les maladies virales, les maladies bactériennes et les maladies parasitaires. Toutefois, on s'attardera aux cas de protection contre les maladies virales puisque notre étude traite de vaccination contre une maladie d'origine virale.

La première évidence de protection par l'immunisation à l'ADN provient d'études faites chez le virus de l'influenza. Dans ces expériences, l'immunisation de souris avec un plasmide codant pour la nucléoprotéine (NP) du virus de l'influenza conférait une protection hétérologue contre un challenge avec le virus (Ulmer *et al.*, 1993). Depuis, plusieurs modèles animaux démontrent une réponse immunitaire protectrice suite à la vaccination à l'ADN, notamment le modèle de l'hépatite B (Prince *et al.*, 1997) et du virus du papillome humain (chez le lapin et le bovin) (Donnelly *et al.*, 1996; Gaukroger *et al.*, 1996; Kirnbauer *et al.*, 1996) qui induisent plus de 75 % des carcinomes reliés aux infections virales (Campo et Jarrett, 1994). D'autres modèles de protection concernent le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Yokoyama *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 1995), le virus de la rage (Xiang *et al.*, 1994), le virus de l'herpès bovin 1 (BVH-1) (Manickan *et al.*, 1995; McClements *et al.*, 1996; Bourne *et al.*, 1996), le virus de l'influenza (Fynan *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1994) ainsi que le HIV (Boyer *et al.*, 1997b). Dans le cas du HIV, beaucoup

d'espoirs se fondent sur ce vaccin puisqu'il confère une immunité protectrice contre un challenge hétérologue chez les singes et fait l'objet d'études cliniques (Chattergoon *et al.*, 1997).

## **1.18 STRATÉGIES D'OPTIMISATION**

Le but initial des vaccins à l'ADN de première génération est de démontrer l'habileté des constructions plasmidiques à générer des réponses humorales et cellulaires *in vivo* de manière sécuritaire et bien tolérée. Par la suite, le raffinement des stratégies de vaccination, pour monter une immunité cliniquement efficace, constitue le but des vaccins de deuxième génération. Ces vaccins requièrent la modulation de l'amplitude et de la direction (humorale et/ou cellulaire) de la réponse immunitaire induite. Pour ce faire, une variété de tactiques permettent de manipuler la réponse à différents paliers. Outre la modification du régime d'immunisation, la majorité des stratégies affectent l'initiation de la réponse immunitaire alors que d'autres jouent sur les fonctions effectrices suite à l'activation de l'immunité cellulaire. Dans cette introduction nous ne traiterons que de l'effet de la voie d'injection et de la localisation de la protéine.

### ***1.18.1 Effet de la voie d'injection***

Dans la majorité des cas, il semble que la voie intradermique favorise la production d'anticorps alors que l'injection intramusculaire augmente la réponse CTL par rapport aux autres voies (Gardner *et al.*, 1996). Cette dichotomie entre les deux voies peut refléter une différence dans l'accessibilité de l'antigène cible à la voie endogène et exogène du processing et de la présentation. De plus, la disparité des types cellulaires transfectés affecte la présentation de l'antigène. Par exemple, la transfection de cellules dendritiques lors de l'injection intradermique favorisera la présentation par le CMH II par rapport à la voie

intramusculaire où les antigènes non-sécrétés sont restreints majoritairement aux myocytes et au transfert aux APC pour la présentation via le CMH I.

### ***1.18.2 Localisation de l'antigène***

Les connaissances actuelles du processing et de la présentation de l'antigène dans les cellules de mammifères suggèrent qu'une modification de la destination et du ciblage de ce dernier affecte la réponse immunitaire envers l'antigène. Pour stimuler une réponse cytotoxique, un antigène cytoplasmique peut être préféré pour le processing et la présentation directe via le CMH I. D'un autre côté, la sécrétion de l'antigène peut encourager la réponse humorale en rendant plus disponible la protéine pour la prise et la présentation via le CMH II par les APC et les cellules B.

La localisation d'une protéine peut être altérée par l'insertion ou la délétion de séquences signal ou de domaines transmembranaires. De cette façon, la protéine peut se retrouver au niveau du cytoplasme, de la membrane ou encore à l'extérieur de la cellule. Quelques études relatent l'effet de la localisation de la protéine au niveau cellulaire sur la réponse immunitaire par immunisation à l'ADN. En utilisant différentes constructions codant pour l'ovalbumine ciblant la protéine à la membrane, au cytoplasme et à l'extérieur de la cellule, Boyle et ses collaborateurs (1997) ont comparé les réponses humorales et cellulaires obtenues selon la distribution de l'antigène. La forme sécrétée de l'antigène induit une production d'anticorps nettement supérieure à la forme membranaire et cytoplasmique. Cela peut s'expliquer par les différences de disponibilité de l'antigène pour stimuler les APC dont les cellules B au niveau des nodules lymphatiques. La réponse cellulaire, quoique légèrement inférieure pour la forme cytoplasmique, est relativement équivalente pour les trois formes. Plusieurs études suggèrent que le ciblage des protéines au RE par l'ajout ou le remplacement d'une séquence signal augmente considérablement le taux d'expression (Gardner *et al.*, 1996; van Rijn *et al.*, 1996). En augmentant le taux d'expression, la forme sécrétée de l'antigène pourrait être pratiquement aussi disponible que la forme cytoplasmique pour la dégradation en peptides et la présentation par le CMH de classe I pour stimuler la présentation aux

cellules CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus par Xiang qui a examiné la réponse immunitaire après immunisation à l'ADN codant une forme sécrétée et membranaire de la glycoprotéine de la rage (Xiang *et al.*, 1995). Une légère augmentation du titre d'anticorps survient pour les souris immunisées avec la forme sécrétée alors qu'aucune différence ne peut être observée dans la réponse CTL. La même histoire se répète avec la nucléocapside de l'hépatite C où la protéine sécrétée produit des titres d'anticorps plus importants que la forme non sécrétée (Inchauspe *et al.*, 1997). Toutefois, des disparités peuvent s'observer à long terme. En effet, dans le cas de la glycoprotéine D de l'herpes viral bovin de type I (HBV-1), malgré que la forme ancrée à la membrane générât des quantités beaucoup plus importantes d'anticorps que les deux autres formes pendant les dix premières semaines, c'est la forme cytoplasmique qui donnait le plus d'anticorps après 23 semaines (Lewis *et al.*, 1997). Malheureusement, l'étude ne mentionne pas si l'antigène cytoplasmique se retrouve dans le milieu extracellulaire pour la stimulation des cellules B comme dans le cas de l'étude d'Haddad (1997).

La modification de la localisation d'une protéine n'assure pas un succès garanti sur la réponse immunitaire. Par exemple, l'ajout/retrait de domaines transmembranaires peut modifier la structure de la protéine et diminuer ainsi la reconnaissance de la protéine de type sauvage, comme dans l'exemple de la glycoprotéine G de la rage (Xiang *et al.*, 1995). Dans ce cas, les deux formes protéiques (transmembranaire et sécrété) induisent des réponses similaires en termes de prolifération des lymphocytes T alors que la réponse des cellules B est clairement supérieure suite à l'injection du vecteur exprimant la forme complète. La majorité des épitopes B de la protéine G du virus de la variole dépendent de la conformation, et par conséquent un changement de structure au niveau de la protéine diminue l'immunogénicité (Xiang *et al.*, 1995). Le ciblage au RE par l'ajout d'une séquence signal peut provoquer l'ajout de glycosylations et donc altérer le processing de certains épitopes et la reconnaissance de d'autres. Afin de remédier à ce problème, de la mutagenèse dirigée doit être faite pour éliminer les sites de glycosylation. Ce problème tend à être fréquent pour les protéines bactériennes et les protéines non-ciblées au RE.

## **1.19 SÉCURITÉ**

La sécurité des vaccins constitue un des paramètres les plus importants de leur utilisation. Trois aspects sécuritaires s'avèrent inquiétants dans le cas de la vaccination à l'ADN. On note la possibilité d'intégration du plasmide dans le génome de l'hôte, la production d'anticorps pathogéniques dirigés contre l'ADN et la tolérance immunologique envers l'antigène exprimé.

### ***1.19.1 Intégration dans le génome***

L'intégration de l'ADN plasmidique dans le chromosome pourrait permettre l'activation subséquente d'un oncogène, la mutation d'un gène suppresseur de tumeurs ou d'un autre gène impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Puisque l'intégration requiert des extrémités d'ADN linéaires, le risque d'intégration est relativement faible vu que le plasmide est circulaire (Lin *et al.*, 1992). Selon des calculs, la probabilité d'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur par intégration d'une molécule d'ADN linéaire est moins de  $10^{-16}$ - $10^{-19}$  (Montgomery *et al.*, 1997). Par conséquent, la probabilité d'intégration de l'ADN circulaire est faible, mais existe. Une seule publication relate une intégration dans le génome. Dans cette étude, un gène de chaîne lourde d'immunoglobuline humaine a été incorporé dans le génome d'une souris (Gerloni *et al.*, 1997). Malgré ce cas isolé, une étude sur l'incorporation génomique utilisant une technique de PCR très sensible capable de détecter 1-7.5 copies de plasmide par 150000 cellules ne soulève aucune intégration du plasmide et ce après plusieurs semaines (Nichols *et al.*, 1995).

### ***1.19.2 Induction de maladies autoimmunes***

La présence d'anticorps pathogéniques dirigés contre l'ADN plasmidique pourrait induire ou exacerber des maladies telles le lupus (SLE). Afin d'analyser cette possibilité,

certains groupes ont mesuré la présence d'anticorps anti-ADN suite à l'administration d'ADN plasmidique (Xiang *et al.*, 1995; Ulmer *et al.*, 1996b). Aucune souris n'a développé de réponse humorale contre le vecteur et donc l'ADN lui-même ne semble pas très immunogénique. La mesure de l'effet de l'administration d'ADN sur le développement de maladies autoimmunes impliquant des anticorps dirigés contre l'ADN, indique que le plasmide n'a pas d'effet significatif sur la progression de la maladie (Mor *et al.*, 1997).

Malgré le fait que le plasmide lui-même ne peut pas induire d'autoimmunité, la protéine encodée, elle, le peut. Un exemple repose dans la vaccination contre le cancer. Un vaccin à l'ADN exprimant la protéine-1 reliée à la gp75/tyrosine kinase murine, qui est surexprimée dans les cellules d'un mélanome, induit une réponse immunitaire protectrice contre un challenge avec des cellules tumorales exprimant un haut niveau de cette protéine (Weber *et al.*, 1998). Toutefois, les souris ont aussi développé une autoimmunité caractérisée avec une dépigmentation de la peau. Cette étude nous indique qu'il y a un certain danger lors d'immunisation avec un gène homologue. La quantité d'antigène de soi présenté dans un contexte normal est probablement insuffisante pour initier une réponse et induit donc la tolérance. Toutefois, une fois que la réponse est montée, l'autoimmunité est générée.

### ***1.19.3 Induction de tolérance***

La tolérance immunologique peut être induite par de multiples injections de faibles quantités d'antigène, telle est la stratégie mise de l'avant afin d'éliminer certaines allergies. La faible production d'antigène pendant une période de temps prolongée produite par l'immunisation génétique (Wolff *et al.*, 1992b) devient donc un propos important dans l'induction de tolérance au lieu d'immunité. Alors qu'aucune donnée ne suggère l'induction de tolérance chez les souris adultes (Liu *et al.*, 1997), il semble que la tolérance peut être induite chez les nouveaux-nés par l'injection d'ADN plasmidique (Mor *et al.*, 1996), malgré le fait que les nouveaux-nés puissent monter des réponses humorales et cellulaires par vaccination à l'ADN.



Dans certains cas, l'ADN peut même briser la tolérance contre certains antigènes. Des souris transgéniques pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) tolère le transgène par virtue d'expression ontogénétique de l'antigène par les hépatocytes (Schirmbeck *et al.*, 1995; Ulmer *et al.*, 1996b). L'immunisation de ces souris avec le gène codant pour le HBsAG induit une réponse humorale et cellulaire qui permet l'élimination de l'expression du transgène dans les cellules du foie sans dommage apparent aux cellules (Ulmer *et al.*, 1996b; Davis *et al.*, 1997). Ulmer *et al.* (1996b) affirment que ces résultats signifient que la vaccination à l'ADN permet de surmonter l'état de tolérance probablement en affectant le mode de présentation de l'antigène et la nature des APC. Toutefois, vu les hépatocytes intacts, on devrait plutôt croire qu'une régulation à la baisse de l'expression de gènes viraux provient probablement de l'effet immunostimulateur de l'ADN (production d'interféron). Cette stratégie pourrait s'avérer efficace dans le traitement des animaux souffrant d'infections persistantes.

## **C) OBJECTIFS**

### **1.20 MISE EN CONTEXTE**

Les infections au BVDV provoquent des pertes économiques importantes à travers le monde. La mise au point d'un vaccin efficace pourrait faire épargner des millions de dollars à l'industrie bovine. Malgré plusieurs tentatives, les vaccins conventionnels n'ont pas réussi à contrôler les infections de façon efficace et sécuritaire. Notre groupe de recherche s'est donc proposé de tenter de mettre au point un vaccin à l'ADN qui répondrait aux lacunes des autres types de vaccins présentement disponibles sur le marché. Puisque gp53 permet la production d'anticorps capables de neutraliser l'infection virale, le gène de gp53 a été utilisé afin de démontrer la faisabilité de cette technique de vaccination pour le BVDV.

## **1.21 PROBLÉMATIQUE ET EXPÉRIENCE PRÉLIMINAIRE**

La présence d'anticorps neutralisants, suite à l'injection de souris avec un vecteur d'expression eucaryote contenant le gène gp53 du BVDV (pCMVigp53) (Harpin *et al.*, 1997), a poussé le groupe de recherche à mettre la technologie à l'épreuve chez le bovin. Le challenge de bovins immunisés à l'aide de pCMVigp53 démontra une protection partielle contre la diarrhée virale bovine (Harpin *et al.*, 1999). Par le fait même, il fut montré que cette construction plasmidique générait des réponses immunitaires humorales et cellulaires *in vivo* de manière sécuritaire et contrôlée. Dans le but de poursuivre dans la même optique, c'est-à-dire de produire un vaccin cliniquement efficace, nous devons apporter des modifications au vaccin pour essayer d'obtenir une protection complète. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de la voie d'injection ainsi que de la localisation de la protéine gp53 sur la réponse immunitaire par vaccination à l'ADN chez la souris.

Une expérience préliminaire nous a permis de déterminer la localisation de gp53 au niveau de la cellule suite à son expression après immunofluorescence de cellules eucaryotes transfectées avec pCMVigp53. Suite à une fixation différentielle, nous avons constaté que gp53 se trouvait ancrée dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Serge Harpin, communication personnelle). Rappelons-nous que la fixation à la paraformaldéhyde sans perméabilisation au Triton X-100 permet de visualiser les antigènes membranaires alors que la fixation à l'acétone rend possible la visualisation des protéines membranaires et cytoplasmiques (Elahi *et al.*, 1997). Cette expérience formait la base de la mise au point d'un vaccin de deuxième génération. En effet, la délétion de la portion transmembranaire en C-terminal de la glycoprotéine 53 devrait affecter sa localisation, en provoquant sa sécrétion dans le milieu, ce qui augmenterait la dose d'antigène effective pour la présentation via le CMH II et ainsi favoriser la production d'anticorps.

## **1.22 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES**

Après le clonage de gp53 sans sa portion d'ancrage à la membrane en C-terminal dans le vecteur d'expression eucaryote pCMVi (pCMVigp53ΔTMR), nous avons procédé à une série de transfections. Une première servit à vérifier l'expression et l'intégrité de la protéine par immunofluorescence. La seconde permet, à l'aide d'une immunoprécipitation, de s'assurer de la sécrétion de la forme délétée de gp53 dans le milieu, du moins *in vitro*. Ensuite, nous avons comparé l'efficacité de la réponse immunitaire induite selon la localisation de gp53 (transmembranaire et sécrétée) selon les voies d'injection intramusculaire et intradermique. Parmi les paramètres évalués, on regarda la séroconversion, la cinétique de production des anticorps ainsi que la détermination des titres d'IgG totaux, des titres d'anticorps neutralisants et des isotypes pour l'immunité humorale. En ce qui a trait à l'immunité cellulaire, la prolifération des splénocytes, le dosage des cytokines IL-2, IL-4 et IFN- $\gamma$  et la cytotoxicité formaient les variables évaluées.

Dans un deuxième temps, nous avons criblé les gènes p20, p14, gp48 et gp25 du BVDV dans un vaccin génétique afin de cibler d'autres gènes potentiels pour l'élaboration d'un éventuel vaccin. Un de ces gènes pourrait contribuer substantiellement dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre le BVDV. La réponse immune contre ces gènes fut caractérisée au même titre que celle pour gp53.

## **CHAPITRE 2**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **2.1 SOUCHES VIRALES DE BVDV**

La souche cytopathogénique 93-1 du BVDV, isolée au Québec lors de l'épidémie de 1993, a été utilisée dans de cette étude. Cette souche partage une homologie de plus de 96% dans la séquence du cDNA avec la souche NADL (type I) au niveau des gènes p14 et gp53 (Elahi *et al.* 1997). Nous nous sommes également servis de la souche cytopathogénique 125 (type II) (Bolin et Ridpath, 1996).

#### **2.2 PROPAGATION DU BVDV**

##### ***2.2.1 Culture cellulaire***

La culture de cellules de la lignée Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK; ATCC CCL22) était faite dans du DMEM contenant 1 mM pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U.I./mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine et 10% de sérum de cheval (HS; Gibco). Lorsque les cellules atteignaient la confluence (flacon de 25 cm<sup>2</sup>), le milieu de culture était décanté et le feuillet cellulaire lavé avec 2 mL de DMEM sans sérum. Un deuxième lavage, avec 4 mL de HBSS cette fois-ci, précédait l'incubation du feuillet avec 2-3 mL de trypsine-EDTA (0,5% et 0,04% respectivement) pendant environ 5 minutes à 37°C. Suite au décollement des cellules, l'ajout de 3 mL de milieu avec sérum permettait la neutralisation de la protéase. La suspension cellulaire était transférée dans un tube conique de 15 mL contenant déjà 6 mL de DMEM. Le tout était centrifugé pendant 5 minutes à 1000 rpm (250 g). Le culot de cellules était ensuite resuspendu dans 2 mL de milieu complet et la viabilité

cellulaire déterminée à l'aide d'un décompte sur hémacytomètre. L'inoculation d'un flacon de 25 cm<sup>2</sup>, avec 5 mL de milieu complet contenant 3x10<sup>5</sup> cellules, complétait le passage. L'incubation des cellules se faisait à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> en tout temps.

### **2.2.2 Infection**

Le processus d'infection des cellules bovines constituait une étape importante du projet puisque la qualité des extraits qui en ont découlé permettaient d'obtenir des résultats plus précis. La veille avant la propagation virale, des cellules MDBK en phase exponentielle étaientensemencées dans des flacons de 175cm<sup>2</sup>. Avant d'infecter les cellules bovines, nous attendions que celles-ci soient confluentes à environ 80%. La monocouche cellulaire, lavée deux fois avec du HBSS, était infectée avec une MOI de 2 dans un volume minimal de DMEM contenant 2% HS. Afin de permettre l'adsorption virale, les cellules étaient incubées 90 minutes à 37°C en agitant le flacon aux 15 minutes dans le but d'éviter l'assèchement du feuillet cellulaire. Après la disposition du milieu d'infection, du milieu frais était ajouté et les cellules infectées étaient incubées à 37°C jusqu'à l'apparition de l'effet cytopathogène (environ 72 heures). Cet effet s'observe lorsque les cellules s'arrondissent et finissent par se détacher. Par la suite, on procédait au détachement des cellules avec un policeman. Après le transfert dans un tube conique de 50 mL (Falcon), les étapes subséquentes différaient selon le type de préparation que l'on voulait faire.

## **2.3 PRÉPARATIONS VIRALES**

Les techniques de préparations virales, à partir des cellules infectées, variaient en fonction du type de test immunologique effectué. En outre, des extraits de protéines cellulaires servaient de matière première pour les ÉLISA. De plus, alors que la séroneutralisation utilisait des stocks de virus bruts, la prolifération nécessitait une purification partielle.

### **2.3.1 Préparation de l'extrait viral pour le test ÉLISA**

Cet extrait de protéines membranaires de cellules infectées avec le BVDV servait d'antigène pour la détection des anticorps montés contre les protéines du virus. Suite à la centrifugation de 10 minutes à 250 xg du tube conique contenant les cellules infectées, le surnageant était aliquoté (pour la séroneutralisation) et le culot cellulaire lavé 2 fois avec du PBS. Après recentrifugation, la resuspension du culot se faisait à l'aide de 0,75 mL de tampon carbonate/bicarbonate 50 mM pH 9,6. La lyse cellulaire, faite par congélation (-70°C) et décongélation (20°C) à trois reprises, était vérifiée par microscopie. Le lysat était ensuite centrifugé 15 minutes à 750 xg, afin d'éliminer la majorité des débris cellulaires, et le surnageant transféré dans un tube microfuge. Pour chaque 100 µL de surnageant, 20 µL de N-octylglucoside 10 % dans de l'eau déminéralisée assurait la solubilisation des protéines membranaires. L'incubation de cette mixture 1 heure à la température de la pièce en précédait une autre O/N dans le frigo à 4°C. Le dosage des protéines par la méthode de Bradford permettait d'aliquoter l'extrait dans des tubes à raison de 20 µg/mL dans le tampon carbonate/bicarbonate 50 mM pH 9,6 contenant 1,5% de N-octylglucoside. Le tout était conservé à -20°C.

### **2.3.2 Purification sommaire du virus pour le test de prolifération**

Puisque les préparations virales contaminées de débris cellulaires donnent un bruit de fond plus important lors du test de prolifération (Kimman *et al.*, 1993), nous avons procédé à une purification partielle de l'extrait viral. Le virus purifié servait d'antigène pour la stimulation spécifique de certains lymphocytes de souris immunisées avec nos plasmides. Nous avons procédé comme suit. La suspension cellulaire infectée était congelée (-70°C) et décongelée (20°C) à trois reprises. Par la suite, la clarification du surnageant se faisait par centrifugation à 750 xg durant 15 minutes. Le surnageant était ensuite concentré sur un coussin de sucrose, 20% dans le TNE ( 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl et 1 mM EDTA),

en centrifugeant pendant 2 heures à l'aide d'un rotor SW28. La resuspension du culot dans 1 mL de TNE précédait la centrifugation sur un gradient de sucrose (50%/40%/20%) à 35000 rpm avec un rotor SW50. Les différentes bandes étaient récoltées et l'indice de réfraction mesuré (le BVDV ayant un indice de réfraction de 1,11-1,14 g./cm<sup>3</sup>). La bande d'intérêt était diluée dans 3 mL de tampon TNE et recentrifugée sur un coussin de sucrose 20% pendant 2 heures. Après resuspension du culot dans 500 µL de tampon TNE, le tout était aliquoté et congelé à -70°C à raison de 50 µL par vial.

### ***2.3.3 Préparation d'un stock de virus pour la séroneutralisation***

Ce stock de virus était utilisé afin de déterminer la présence d'anticorps neutralisants l'infection virale dans les sérums de souris. Il ne nécessitait pas de purification, si ce n'est d'éliminer certains débris cellulaires. La congélation/décongélation (-70°C/20°C) du stock de cellules infectées provoquait la lyse cellulaire et le relâchement de virions supplémentaires dans le milieu de culture. Une centrifugation de 15 minutes à 750 xg permettait d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant clair qui était aliquoté dans des tubes microfuges et congelé à -70°C jusqu'à utilisation. Les stocks aliquotés faisaient l'objet de titration dans le but de déterminer avec précision le TCID<sub>50</sub>.

## **2.4 TITRATION DU BVDV**

Afin de s'assurer de la reproductibilité des tests effectués, nous avons titré tous les stocks de BVDV pour utiliser des quantités relativement identiques de virus fonctionnels pour les essais. Douze heures avant l'infection, une suspension cellulaire de 1x10<sup>5</sup> cellules/mL était distribuée à raison de 100 µL par puits dans une plaque à 96 puits à fond plat (Falcon 3072). Après 12 heures d'incubation, des dilutions logarithmiques du stock de virus ont été faites jusqu'à 10<sup>-9</sup> avec du DMEM contenant 2% de HS inactivé à la chaleur

(56°C, 30 min.). Une incubation de 90 minutes à 37°C de 50 µL de chaque dilution en quadruplicata permettait l'adsorption virale au niveau des cellules. Après l'infection, le milieu était changé pour 100 µL de milieu frais avec 2% HS et incubé pendant 3-4 jours à 37°C. La visualisation des foyers infectieux se faisait soit avec la technique d'immunoperoxydase ou l'observation visuelle. Afin de caractériser le titre obtenu, nous avons employé la notion du TCID<sub>50</sub>. Le TCID<sub>50</sub>, calculé selon la méthode standard de Reed and Muench, représente la dilution virale requise pour infecter 50% des cultures cellulaires inoculées. Un exemple de calcul est donné à l'annexe 1.

#### ***2.4.1 Immunoperoxydase***

Le test d'immunoperoxydase servait à identifier les cellules qui étaient infectées pour la titration du virus BVD 125. Ce virus est moins cytopathogène que son compatriote Singer et par conséquent les différences de morphologie qu'il provoque sont plus subtiles. Ce test fut utilisé à l'occasion pour confirmer les résultats de cytopathogénicité à l'aide du protocole suivant. Après un lavage des cellules avec du PBS, la monocouche cellulaire était séchée pendant une heure à 37°C. Ensuite, la fixation des cellules se faisait à l'aide d'une solution de PBS froide contenant 20% d'acétone et 1% HS pendant 10 minutes à 4°C. Le feuillet était de nouveau séché pendant 2 heures à 37°C ou O/N à la température de la pièce. Après réhydratation de la microplaque, un anticorps bovin α-BVDV dilué 1/50 dans du PBS contenant 10 % de HS (tampon de dilution) était ajouté aux cellules à raison de 50 µL et incubé pendant 1 heure à 37°C. Afin de détecter les anticorps liés, 50 µL d'une solution de détection (dilutions 1/500 d'anticorps α-bovin couplé à la biotine (Jackson Immunoresearch) et de streptavidine-HRP (Amersham) dans le tampon de dilution) était additionné aux puits et incubé pendant une heure à 37°C. Les puits étaient révélés avec l'AEC selon des procédures standards (Harlow and Lane, 1988). Les dépôts de coloration rouge-brun indiquaient qu'il y avait eu infection. Notons qu'il y avait 5 lavages au PBS entre chaque étape du protocole.



## 2.5 PLASMIDES

Deux formes de la gp53 du BVDV ont été construites sous le contrôle du promoteur CMV dans le vecteur d'expression eucaryote pCMVintron. Ce plasmide permet l'expression des gènes qu'il encode dans les cellules de mammifères suite à l'injection d'ADN plasmidique dans les tissus de l'hôte. La forme naturelle de gp53 (TMR) provenait du Dr. Serge Harpin (Université de Montréal) et la forme sans la portion TMR a été sous-clonée, suite à une amplification par PCR, dans le pCMVi pour générer la sécrétion de la glycoprotéine. Le vecteur contenant les gènes p20, p14, gp48 et gp25 (pCMVp20.62) provenait également du Dr. Serge Harpin.

## 2.6 AMPLIFICATION DE GP53 $\Delta$ PAR PCR

Afin de générer une forme de gp53 sans la portion transmembranaire (TMR) en C-terminal, nous avons amplifié la région 2414-3490 du génome du BVDV 93-1 selon la séquence du BVDV NADL (Genbank, no. accession M31182), la portion TMR du gène débutant au nucléotide 3491 (Paton *et al.*, 1992). Les amorces utilisées sont celles de la figure 5. Une séquence Kozak, reconnue comme optimale pour initier la traduction chez les ribosomes eucaryotes (Kozak, 1986), a été ajoutée dans l'amorce sens afin d'augmenter la traduction de la protéine et ainsi augmenter son expression dans les cellules de mammifères. L'amplification a été faite comme suit. Dans un tube microfuge stérile de 0,5 mL, les ingrédients suivants ont été additionnés et mélangés séquentiellement : 30  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O nanopure stérile, 10  $\mu$ L de tampon d'amplification 10 X (100 mM Tris-HCl pH 9,0, 15 mM MgCl<sub>2</sub> et 500 mM KCl), 10  $\mu$ L de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) 2 mM, 100 pmoles de chaque amorce, 5  $\mu$ L de DMSO, 50 ng de pCMVgp53 et le volume a été complété à 100  $\mu$ L. Suite au chauffage du mélange à 94°C pendant 5 minutes, 2 unités d'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq polymérase; Pharmacia Biotech) et 100  $\mu$ L d'huile minérale ont été ajoutés. La réaction d'amplification suivait le profil cyclique: 45 secondes à 94°C, 60

Amorce 1 5' **GCGGATCC ACC ATGGTACAGGGCAT**<sub>3</sub>,

GGATCC = Site Bam HI

ACCATGG = Séquence Kozak

Le gène débute au codon ATG indiqué en caractères gras.

Amorce 2 5' **GCTCTAGATCAGGACTCAGCGAAGTA**<sub>3</sub>,

TCTAGA = Site Xba I

TCA = Codon stop

Les lettres en caractères gras font parti du gène.

**Figure 5 : Amorces utilisées pour amplifier le gène gp 53 de la souche 93-1 sans la portion transmembranaire (gp53ΔTMR) par PCR.**

secondes à 52°C et 90 secondes à 72°C en employant un STEP CYCLE. Après 30 cycles, l'ajout d'une dernière étape d'élongation de 10 minutes à 72°C permettait l'obtention d'un maximum de produits complets. La vérification du résultat d'amplification a été faite sur gel d'agarose 1% dans le tampon TAE (40 mM Tris-acétate pH 8,3, 1 mM EDTA). La bande d'intérêt fut coupée, et l'ADN extrait par Gene Clean selon une procédure publiée par Vogelstein et Gillespie (1979). L'insert était maintenant prêt pour le clonage.

## **2.7 CLONAGE ET SOUS-CLONAGES DU PRODUIT DE PCR ET DE GP53**

### **2.7.1 Préparation du vecteur pcDNA3**

Comme la Taq polymérase additionne pratiquement toujours un nucléotide supplémentaire ne faisant pas partie de la matrice d'amplification, soit presque toujours un dATP, l'efficacité de clonage est augmentée lorsque le vecteur destiné à recevoir l'insert possède un T à ses extrémités franches (Ausubel *et al.* 1995). La digestion de 5 µg du vecteur pcDNA3 (Invitrogen) par *Eco RV* a permis de générer une extrémité blunt. Nous avons ensuite utilisé la procédure publiée par Ausubel et ses compatriotes (1995) pour ajouter un dTTP aux extrémités franches du vecteur. Après une extraction phénol/chloroforme (Sambrook *et al.*, 1989) et une précipitation à l'éthanol, le vecteur resuspendu était maintenant prêt à recevoir le fragment amplifié par PCR (gp53ΔTMR).

### **2.7.2 Clonage de gp53ΔTMR dans le pcDNA3**

La réaction de ligation comprenait 100 ng de vecteur pcDNA3 préparé, différents ratios d'insert purifié par Gene Clean (gp53ΔTMR) (0, 20, 60 et 100 ng), 1 mM ATP, 1 µL de tampon OPA 10X, 1 mM HCC et 0,1 U de T4 DNA ligase. Le tout se trouvait dans un volume final de 10 µL et subissait une incubation de 4 heures à 15°C. Après transformation

des produits de ligation en bactérie selon des procédures standards (Sambrook *et al.*, 1989), des minipréparations d'ADN ont été faites à partir des transformants. Une analyse de restriction avec l'enzyme *Nde I* a permis de s'assurer que l'insert se trouvait dans la bonne orientation (génération de deux fragments de 1360 et 5190 pb (bonne orientation) au lieu de 680 et 5870 pb (mauvaise orientation)). Ce plasmide a reçu le nom de pCMVgp53ΔTMR.

### **2.7.3 Sous-clonage de gp53 et gp53ΔTMR dans le pCMVi**

Les constructions originales de gp53 avaient été faites dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. Les deux variantes du gène gp53, complète et tronquée, ont par la suite été clonées dans le vecteur pCMVi (aimablement fourni par le Dr. Serge Harpin) puisque ce dernier comporte l'intron A, séquence reconnue pour augmenter le taux d'expression dans les cellules de mammifères en stabilisant le transcrit (Chapman *et al.*, 1991). Le plasmide pCMVi a été digéré avec *Eco RV* et subit une purification phénol/chloroforme. Par la suite, le plasmide a été digéré avec *Xba I* (les deux enzymes ne coupaient pas bien lorsque mises ensembles). Le plasmide pCMVgp53ΔTMR a été digéré avec *Bam HI* et l'enzyme inactivée pendant 15 minutes à 85°C. Afin de rendre l'extrémité compatible avec celle générée par *Eco RV*, l'ajout de 2 unités de Klenow et d'un µL de dNTPs 1 mM a permis de produire des extrémités franches lors de l'incubation de 30 minutes à 37°C. Après une purification phénol/chloroforme, pCMV53ΔTMR a subit une seconde digestion par *Xba I*. La purification du vecteur et de l'insert (pCMVi et l'insert gp53ΔTMR) par Gene Clean précédait la ligation des deux fragments selon des conditions similaires à celles de 53ΔTMR dans le pcDNA3. Après transformation, l'ensemencement de colonies et des minipréparations, une analyse de restriction avec *Eco RI* et *Xba I* a permis de voir que le clone contenait bel et bien l'insert. Le gène gp53 a lui aussi été sous-cloné de la même façon dans le pCMVi. Les nouvelles constructions ont reçu les noms de pCMVigp53ΔTMR et pCMVigp53 respectivement.

#### **2.7.4 Sous-clonage de gp53 et sa forme tronquée dans pSecTagB**

Le vecteur pSecTag (Invitrogen) comporte un signal de sécrétion avant le site de clonage multiple et est disponible pour les trois cadres de lecture possibles. Malgré que nous retrouvions la protéine à la surface cellulaire par immunofluorescence, nous avons utilisé ces vecteurs contenant les deux variantes de gp53 en tant que contrôles pour la sécrétion potentielle de la glycoprotéine. Nous avons procédé ainsi puisque selon le modèle de maturation de la polyprotéine du BVDV suggéré par Rumenapf et ses collaborateurs (1993), la séquence hydrophobe du gène gp25, présente en amont du premier codon de gp53, pourrait bien être nécessaire pour que gp53 se retrouve à la surface membranaire. Cette séquence du gène gp25, employée par quelques auteurs dont Bolin et Ridpath (1996), ne se trouvait pas dans le vecteur utilisé initialement pour démontrer les capacités de gp53 à induire une réponse immunitaire par vaccination à l'ADN (voir Harpin *et al.*, 1997 et 1999). Nous avons construit ces vecteurs selon la procédure suivante. Après la digestion des plasmides pCMVigp53 et pCMVigp53ΔTMR par *Hind III* et *Apa I*, les gènes codant pour gp53 (bandes 1300 et 1080 respectivement) ont été purifiés par Gene Clean. Le vecteur pSecTag B a lui aussi été digéré *Hind III*-*Apa I* et purifié par Gene Clean. Le vecteur et les inserts ont ensuite été ligués selon des conditions standards et transformés. Une analyse de restriction des minipréparations d'ADN des colonies confirmait que les vecteurs contenaient bel et bien les inserts. Ces constructions furent nommées pSecTag gp53 et pSecTag gp53ΔTMR.

#### **2.7.5 Séquençage des constructions**

Les différentes constructions ont été séquencées au service de séquençage du Biotech Center de l'Université McGill à l'aide de nucléotides fluorescents. La préparation de l'ADN pour les séquençages se faisait à l'aide d'un kit de minipreps de Qiagen.

## **2.8 TRANSFECTION ET DÉTECTION DE L'EXPRESSION DES CONSTRUCTIONS**

Dans une plaque à 6 puits (Falcon 3037) contenant des lamelles de microscopes stérilisées,  $2 \times 10^5$  cellules/puits de cellules COS-7 (ATCC CRL-1651) étaient ensemencées dans 2 mL de milieu complet (DMEM contenant 10 %CS) et incubées jusqu'à l'atteinte de 80% de confluence. Avant la transfection, le mélange de 2  $\mu$ g d'ADN et 10  $\mu$ L de Lipofectamine (Gibco) dans 200  $\mu$ L final de DMEM sans sérum se faisait dans des tube 12x75 mm. Suite à l'incubation de 30 minutes qui permettait la formation de complexes ADN-liposomes, 0,8 mL de DMEM sans sérum était ajouté aux complexes et le tout était versé sur les cellules. Après 6 heures d'incubation, 1 mL de milieu complet contenant 20 % de sérum sans antibiotiques (10% final) était ajouté. Le milieu de transfection était changé le lendemain. Par la suite, on procédait à la détection de l'expression des protéines encodées par les vecteurs par immunofluorescence ou radioimmunoprécipitation.

### ***2.8.1 Immunofluorescence***

Dans le but de vérifier l'intégrité des protéines encodées par les vecteurs, nous avons procédé à une immunofluorescence. La monocouche cellulaire transfectée était lavée à deux reprises avec 1 mL de PBS. Les cellules étaient ensuite fixées avec de l'acétone froide (80%) pendant 15 minutes à 4°C. Après la période de fixation, les lamelles étaient séchées pendant 30 minutes. Après rinçage dans du PBS, les lamelles étaient incubées 60 minutes dans du PBS contenant 5 % de lait écrémé. Après trois lavages, une incubation d'une heure dans une solution d'anticorps  $\alpha$ -BVDV (St-Hyacinthe) dilué 1/50 assurait le marquage des protéines du BVDV exprimées par les vecteurs. Afin d'éliminer le surplus d'anticorps et certaines interactions non-spécifiques, les cellules étaient lavées à trois reprises avec du PBS. Dans le but de révéler l'anticorps primaire, les lamelles étaient incubées 30 minutes avec un anticorps anti-bovin couplé à la fluoresceine (Jackson Immunoresearch) dilué 1/50 dans la solution de blocage à l'abri de la lumière. Après 4 lavages, les lamelles étaient conservées dans le PBS

contenant 0,02%  $\text{NaN}_3$  jusqu'à ce que les lamelles furent l'objet d'observations au microscope et de photographies.

### ***2.8.2 Radioimmunoprécipitation de gp53***

Comme les anticorps dirigés contre la protéine gp53 sont d'ordre conformationnels, il nous a été impossible de détecter la protéine par Western Blot. C'est pourquoi nous avons utilisé la radioimmunoprécipitation afin de déterminer si la forme tronquée était sécrétée à l'extérieur des cellules de mammifères. Comme tout protocole classique de radioimmunoprécipitation, celui-ci comporte trois principales étapes. On note le marquage des protéines avec des acides aminés radioactifs, la lyse des cellules ainsi que l'immunoprécipitation proprement dite.

#### **2.8.2.1 Marquage des protéines néosynthétisées**

Des cellules COS-7 préalablement transfectées ont été lavées 2 fois avec du milieu DMEM sans méthionine ni de cystéine (DMEM-). Afin d'éliminer les réserves intracellulaires d'acides aminés contenant du soufre, les cellules ont été incubées 20 minutes à 37°C dans du DMEM-. Par la suite, le milieu fut remplacé par 800  $\mu\text{L}$  de DMEM- contenant 100  $\mu\text{Ci}$  de méthionine et cystéine marquées au  $^{35}\text{S}$  (Promix, Amersham) et incubé pendant 2-4 heures à 37°C. Le surnageant a été transféré dans des tubes microfuges et conservé sur glace jusqu'à l'immunoprécipitation. La plaque à 6 puits a ensuite été mise sur glace et les cellules lavées deux fois avec du PBS froid.

### **2.8.2.2 Lyse cellulaire**

Le tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.2 µg/mL aprotinine et 100 µg/mL PMSF) a été ajouté à chaque puits à raison de 500 µL pendant 30 minutes afin de solubiliser les parois membranaires. Suite au transfert dans des microtubes froids, les lysats ont été centrifugés pendant 5 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires.

### **2.8.2.3 Immunoprécipitation**

Dans le but de diminuer les interactions non-spécifiques, une préadsorption du lysat et du surnageant cellulaire se faisait par l'addition de 2 µL de sérum préimmun de bovin. Après une heure d'incubation à 4°C, 40 µL de protéine G-agarose était ajouté au mélange et incubé 30 minutes avec agitation à 4°C. Suite à 5 minutes de centrifugation à 4°C, le surnageant était transféré dans un autre tube microfuge froid. Ce dernier était dilué ½ dans du tampon NET (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM EDTA et 0.25% gélatine). À ce moment, l'amendement d'un µL de sérum bovin dirigé contre le BVDV précédait une incubation O/N à 4°C avec agitation. La précipitation des complexes immuns se faisait avec 25 µL de protéine G-agarose en agitant pendant 1 heure à 4°C. Après microcentrifugation de 30 minutes à 4°C, les billes étaient lavées une fois dans le tampon NET, deux autres fois dans le tampon NET + 500 mM NaCl ([finale]) et finalement dans le tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Les billes furent resuspendues dans le tampon de chargement 1 X (50 mM Tris pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bleu de bromophénol et 10% glycérol), chauffées 3 minutes à 100°C et centrifugées 1 minute. Le surnageant était ensuite transféré dans un autre tube et un aliquot analysé par SDS-PAGE et autoradiographie.



#### **2.8.2.4 SDS-PAGE et autoradiographie**

Un gel SDS de 10% a été utilisé afin de séparer les constituants contenus dans les échantillons d'immunoprécipitation. Suite à l'électrophorèse, la fixation du gel se faisait par immersion dans une solution de fixation (25% méthanol, 10% acide acétique glacial) pendant 45 minutes avec agitation. Par la suite, le gel était fluorographié à l'aide d'une incubation de 30 minutes dans une solution d'amplification (Amplify; Amersham). Après un rinçage dans de l'eau distillée, le gel était séché et exposé à -70°C pendant 24 - 48 heures.

### **2.9 IMMUNISATIONS ET PRÉLÈVEMENTS SANGUINS**

L'ADN plasmidique pour les injections fut préparée selon une procédure publiée par Boyle et ses collaborateurs (1998b), à l'exception de l'ajout d'une étape de digestion à la protéinase K pendant 2 heures à 37°C à une concentration finale de 1 µg/mL avant l'étape de précipitation au PEG. Les endotoxines ont été extraites selon le protocole décrit par Boyle.

Après les tests *in vitro* et la préparation de l'ADN pour les injections, les rongeurs furent immunisés. Neuf groupes, composés de 6 souris Balb/c de 6-8 semaines chacun, ont été injectés à trois reprises, soit aux semaines 0, 2 et 4 avec les différentes constructions (tableau 3). Les injections se faisaient à raison 100 µg d'ADN dans 100 uL de saline (PBS) sous anesthésie par inhalation de Metofane (Janssen). En ce qui concerne la voie d'injection intramusculaire (I.M.), 50 µL d'ADN était injecté dans l'axe longitudinal de chacun des quadriceps rasés à l'aide d'un tube de polypropylène (stopper), laissant seulement entrer 2 mm de l'aiguille dans le tissu, en prenant bien soin que la souris soit sous l'effet de l'anesthésie durant au moins 1 minute suivant l'injection. En ce qui a trait à l'injection par la voie intradermique, le dos des souris était rasé et désinfecté avec de l'éthanol 70%. Les 100 µL étaient injectés dans les couches de la peau. Toutes les injections se faisaient à l'aide d'une seringue de 1 cc avec des aiguilles de grosseur 30 ½.

**Tableau 3 : Voies d'injections des plasmides selon le groupe d'immunisation.**

<b>Groupe</b>	<b>Plasmide</b>	<b>Voie</b>
<b>A</b>	PCMV <sub>i</sub>	I.M.
<b>B</b>	pCMV <sub>i</sub> gp53	I.M.
<b>C</b>	PCMV <sub>i</sub> gp53 tronqué	I.M.
<b>D</b>	pCMV <sub>p</sub> .20.62	I.M.
<b>E</b>	PCMV <sub>i</sub>	I.D.
<b>F</b>	pCMV <sub>i</sub> gp53	I.D.
<b>G</b>	PCMV <sub>i</sub> gp53 tronqué	I.D.
<b>H</b>	pCMV <sub>p</sub> .20.62	I.D.
<b>I</b>	PCMV <sub>i</sub> gp53 + adjuvant	I.M.

**Légende :** I.M. = injection intramusculaire dans le quadriceps

I.D. = injection dans l'épiderme dorsal (intradermique)

### **2.9.1 Prélèvements de sang**

Les prélèvements sanguins se faisaient par rétroponction orbitale à l'aide de capillaires (Fisher). Deux à quatre cents  $\mu\text{L}$  de sang étaient recueillis, incubés 1 heure à 37°C et transférés à 4°C pour 2 heures. Le sang subissait ensuite une centrifugation à 10000  $\times g$  pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant était prélevé, en prenant bien soin de ne pas toucher au culot de cellules, et aliquoté dans des microtubes identifiés avant d'être congelé à -20°C. Après la décongélation, une centrifugation des sérums de 2 minutes servait à éliminer les agrégats protéiques pouvant interférer ou introduire de la variabilité dans les tests.

## **2.10 CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE HUMORALE**

### ***2.10.1 Standardisation du test ÉLISA pour la détection des IgG totaux***

Afin de détecter les IgG totaux dirigés contre le BVDV, un test ÉLISA a été mis au point à partir d'un sérum murin possédant des anticorps contre le BVDV en faible concentration. Les paramètres standardisés concernent le type de plaque (Maxisorp (Nunc), Polosorp (Nunc) et Microtest III (Falcon)), l'agent de blocage et sa concentration (lait en poudre, BSA, gélatine bactérienne, caséine, PBS et Tween 20) ainsi que les dilutions de l'anticorps secondaire et de la streptavidine-peroxydase.

### ***2.10.2 Mesure des IgG totaux dirigés contre le BVDV par ÉLISA***

Afin de détecter les IgG totaux, 50 µL d'extrait viral (section 2.3.1) était ajouté aux puits d'une plaque Polysorp (Nunc) et incubé O/N à la température de la pièce. Après 5 lavages avec du PBS-Tween 20 0.05%, les puits étaient remplis avec 200 µL de la solution de lavage et incubés pendant 90 minutes. Ensuite, 60 µL d'une dilution 1/100 du sérum murin à tester était ajouté et incubé pendant 3 heures à 37°C. Suite à 5 lavages, 80 µL d'anticorps anti-souris couplé à la biotine (Amersham) dilué 1/16000 était incubé pendant une heure à 37°C. Finalement après 5 autres lavages, 70 µL de streptavidine-HRP dilué 1/4000 dans la solution de lavage était incubés pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les puits étaient lavés 5 fois et révélés selon des procédures standards avec du TMB (Harlow and Lane, 1988). La densité optique corrigée (moyenne des triplicats avec l'antigène moins la moyenne des triplicats sans d'antigène) était calculée pour chaque échantillon. Le titre correspond à une densité optique supérieure à la moyenne des DO<sub>450 nm</sub> corrigées des souris contrôles plus 2 déviations standards ( $P < 0.05$ ). Afin de s'assurer de la spécificité de la réaction, un contrôle utilisant un lysat de cellules non-infectées a été fait.

### ***2.10.3 Isotypage des anticorps dirigés contre le BVDV***

Les isotypes donnent parfois un indice sur le type de réponse cellulaire induite. Les IgG2a témoignent d'une réponse Th1 (cellulaire) alors que les IgG1 relèvent d'une réponse Th2 (humorale). La procédure utilisée pour mesurer les isotypes emploie le même type d'ÉLISA que celui qui mesure les IgG totaux. Au lieu de se servir de l'anticorps  $\alpha$ -souris IgG couplé à la biotine et de la streptavidine-peroxydase, des anticorps reconnaissant soit l'isotype IgG<sub>1</sub> (Pharmingen) ou IgG<sub>2a</sub> (Pharmingen) couplé à la peroxydase ont été utilisés à une dilution de 1/500 et incubés 1 heure à 37°C. La détection a été faite de la même façon que pour l'ÉLISA  $\alpha$ -IgG.

### ***2.10.4 Séroneutralisation***

Les anticorps neutralisants peuvent jouer un rôle capital dans le contrôle des infections virales. L'essai suivant sert à déterminer la présence de tels anticorps contre le BVDV suite à l'immunisation. La veille, les cellules MDBK étaientensemencées à raison de  $2 \times 10^4$  cellules par puits d'une plaque 96 puits à fond plat (Falcon 3072). Après environ 16 heures d'incubation (80-90 % de confluence), l'inactivation des sérums se faisait en chauffant à 56°C pendant 30 minutes. Cette procédure permettait de détruire le complément et autres facteurs labiles ayant des propriétés de neutralisation non-spécifiques. Soixante  $\mu$ L d'une solution de virus contenant 200 TCID<sub>50</sub> de BVDV a été ajouté à 60  $\mu$ L de dilutions doublantes du sérum (débutant à 1/10), diluées dans le DMEM, et incubé une heure à 37°C dans des plaques de culture à 96 puits à fond rond (Costar). Pendant ce temps, les cellules MDBK dans les plaques 96 puits étaient lavées deux fois à l'aide de PBS. Par la suite, 100  $\mu$ L de chaque mélange était ajouté sur la monocouche cellulaire et incubé 90 minutes à 37°C avec 2% de CO<sub>2</sub>. Après cette période d'attachement et d'infection, 100  $\mu$ L de milieu complet avec antibiotiques et 5% de sérum était amendé à chaque puits. Les plaques étaient ensuite incubées 72 heures à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, après quoi nous avons observé visuellement

l'effet cytopathogénique (arrondissement et/ou décollement des cellules). Le titre de neutralisation se définit comme la plus grande dilution donnant une inhibition de l'effet cytopathogène dans au moins 50% des cultures. Chaque dilution de sérum a été testée en duplicata pour les deux types de virus (Singer et 125).

## **2.11 CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE**

### ***2.11.1 Test de prolifération des lymphocytes T murins***

Ce test sert à déterminer si la vaccination à l'ADN avec des gènes du BVDV induit une réponse des cellules T dans un contexte CMH-dépendant. Ce test permet également de déterminer la présence d'une réponse immunitaire mémoire, réponse très importante pour la mise au point d'un vaccin. Dans cette expérience, nous avons effectué ce test passablement longtemps après la dernière immunisation dans le but d'obtenir des résultats mémoires à plus long terme. Six mois après l'injection initiale, les cellules de la rate de 3 souris par groupe ont été prélevées et mises en suspension à une concentration de  $3 \times 10^6$  cellules/mL dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% FBS (testé comme non-toxique et non-stimulateur), 10 mM HEPES pH 7,2,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoéthanol, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 30  $\mu$ M indométhacine (Sigma; USP grade), 100 U.I. pénicilline et 100  $\mu$ g/mL streptomycine. Les splénocytes, à raison de 100  $\mu$ L, étaient ajoutés au puits d'une plaque 96 puits (Falcon 3072) et incubés avec 100  $\mu$ L de BVDV (NADL ou 125) dilué pour atteindre une dilution finale de 1/10, 1/20 et 1/40. Les titres des virus partiellement purifiés atteignaient environ  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL. Après 5 jours d'incubation à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-TdR (2 Ci/mM; Amersham) a été ajouté à chaque puits. Après 6 heures d'incubation, les cellules ont été récoltées sur un filtre en fibre de verre à l'aide d'un cell harvester semiautomatique (Flow Laboratories, Rockville MD). Le test a été fait en triplicata pour chaque dilution. L'indice de stimulation S.I. a été calculé (moyenne de comptes par minute dans les puits stimulés avec l'antigène/ moyenne de comptes par minute dans les puits non-stimulés) pour tous les

échantillons. Afin de s'assurer de la qualité des suspensions cellulaires, la stimulation des splénocytes avec des mitogènes polyclonaux se faisait en employant des concentrations finales de 4 µg/mL pour la Con A, 10 µg/mL pour le PWM et 40 µg/mL pour les LPS, et ce en triplicata.

### **2.11.2 Dosage de cytokines**

Les cytokines sécrétées par les cellules T activées donnent un bon indice de la stimulation de la réponse cellulaire provoquée par la vaccination. Les cytokines IL-2, IL-4 et IFN-γ forment les cytokines les plus souvent dosées (réponse Th1 pour IL-2 et IFN-γ ou Th2 pour IL-4) suite à la stimulation spécifique des lymphocytes avec le virus. Les lymphocytes, étant déjà entrés en contact avec l'antigène, prolifèrent de façon spécifique suite à une restimulation *in vitro*. Ce faisant, ils sécrètent des cytokines afin de stimuler la réponse cellulaire effectrice. Pour cette stimulation, nous avons procédé comme suit. Une suspension cellulaire de  $3 \times 10^6$  splénocytes/mL, provenant des différents groupes de souris injectés, a été utilisée pour inoculer des plaques de culture de 24 puits à raison de 500 µL par puits. Un témoin avec 500 µL de milieu, un autre avec la ConA (8 µg/mL) et deux essais avec 500 µL de suspension virale contenant le BVDV Singer titré à environ  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL ont été effectués en duplicata. Après 3½ jours d'incubation à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, la centrifugation des plaques pendant 5 minutes à 250 xg précédait le prélèvement du surnageant et sa congélation à -20°C. Ces surnageants ont été dosés pour les cytokines IL-2, IL-4 et IFN-γ.

#### **2.11.2.1 Dosage de l'IL-2**

Caractéristique d'une réponse Th0 (lymphocytes non-différenciés) ou Th1 (lymphocytes Th1), le dosage de l'IL-2 par l'Élisa sandwich qui suit donne un indice de

l'immunité mémoire. Afin de doser l'IL-2, 100  $\mu$ L d'anticorps monoclonal de capture de rat  $\alpha$ -IL-2 de souris (Pharmingen no cat. 18161D), à une concentration de 1  $\mu$ g/mL dans du tampon carbonate/bicarbonate 100 mM pH9,5, a été ajouté à chaque puits d'une microplaque Maxisorp (Nunc) et incubé 24 heures dans une atmosphère humide à 4°C. Après 5 lavages solution de lavage (PBS contenant 0,05% de tween 20), les plaques ont été bloquées avec 200  $\mu$ L de tampon de blocage-dilution (PBS contenant 10% FBS (Hyclone no. cat. SH30088)) pendant 1 heure à la température de la pièce. Pendant ce temps, des standards d'IL-2 recombinant (Sigma) dilués dans le tampon de dilution ont été préparés à des concentrations de 0, 15,6, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 et 1000 pg/mL. Par la suite, la plaque fut lavée 5 fois et 50 $\mu$ L de chaque standard, échantillon (dilué ½ et ¼) et contrôles ont été incubés pendant 2 heures à la température ambiante. Après 5 autres lavages, 70  $\mu$ L d'une solution de détection (anticorps monoclonal  $\alpha$ -IL-2 couplé à la biotine (Pharmingen no cat. 18172D), à une concentration de 0,5  $\mu$ g/mL, et de la streptavidine-HRP (Amersham) diluée 1/400 dans le tampon de dilution) a été amendée à chaque puits et incubée 1 heure à la température de la pièce. Après 5 lavages, les puits étaient révélés avec 100  $\mu$ L du substrat TMB selon des procédures standards (Harlow et Lane, 1988) pendant 30 minutes. La courbe standard établie permettait de déterminer la concentration en IL-2 dans chaque échantillon. Chaque échantillon était fait en triplicata.

#### **2.11.2.2 Dosage de l'IL-4**

La sécrétion de l'IL-4 par les lymphocytes T stimulés sert à amplifier la réponse immunitaire humorale en favorisant la différenciation des cellules B pour la sécrétion d'anticorps. Nous avons dosé cette cytokine à l'aide de la trousse OptEIA™ de Pharmingen (No. cat. 2651KK) selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, 100  $\mu$ L d'anticorps de capture  $\alpha$ -IL-4 (no. cat. 26511E), dilué 1/250 dans le tampon carbonate/bicarbonate 100 mM pH 9,5, a été ajouté à chaque puits d'une plaque Maxisorp (Nunc) et incubé 24 heures à 4°C. Les sites non-occupés ont été bloqués avec 200  $\mu$ L de

tampon de dilution OptEIA (no. cat. 26411E) pendant 2 heures. Des standards d'IL-4 (no. cat. 26516E) de concentration 0, 7,8, 15,6, 31,25, 62,5, 125, 250 et 500 pg/mL ainsi que les échantillons (dilués ½ et ¼) et les contrôles ont été ajoutés à raison de 50 µL par puits et incubés 2 heures. Ensuite, 70 µL de la solution de détection (α-IL-4 biotinylé dilué 1/250 (no.cat 26437E) plus avidine-HRP dilué 1/250 (no. cat. M039857)) a été ajouté et incubé une heure à RT. La détection a été faite comme pour l'élisa pour doser les IgG. Notons que 5 lavages étaient entre chaque étape avec du PBS-Tween20 0,05%. La courbe standard établie permettait de déterminer la concentration en IL-4 dans chaque échantillon. Chaque échantillon était fait en triplicata.

#### **2.11.2.3 Dosage de l'IFN-γ**

L'IFN-γ, cette cytokine multifonctionnelle, est un facteur sécrété principalement par les cellules T activées et en moindre partie par les cellules NK. Il provoque l'activation de l'immunité cellulaire effectrice. Le taux d'IFN-γ a été mesuré à l'aide de la trousse OptEIA™ de Pharmingen (No. cat. 2612KI) selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, 100 µL d'anticorps de capture α-IFN-γ (no. cat. M038595), dilué 1/500 a été ajouté à chaque puits d'une plaque Maxisorp (Nunc) et incubé 24 heures à 4°C. Le blocage des sites non-occupés a été effectué avec 200 µL de tampon de dilution OptEIA (no. cat. 26411E) pendant 2 heures. Des standards d'IFN-γ (no. cat. M038597) de concentration 0, 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 et 4000 pg/mL ainsi que les échantillons (dilués ½ et ¼) et les contrôles ont été ajoutés à raison de 50 µL par puits et incubés 2 heures. Ensuite, 70 µL de la solution de détection (α-IFN-γ biotinylé dilué 1/125 (no.cat M038596) plus avidine-HRP dilué 1/250 (no. cat. M038598)) a été ajouté et incubé une heure. Suite à 10 lavages, la détection a été faite à l'aide du TMB. Notons que 5 lavages séparent chacune des étapes (PBS-Tween20 0,05%). La courbe standard établie permettait de déterminer la concentration en IFN-γ dans chaque échantillon. Chaque échantillon était fait en triplicata.



### **2.11.3 Test de cytotoxicité**

La caractérisation la réponse des cellules T suite à la vaccination a également été faite pour déterminer la présence d'une réponse cytotoxique induite par la vaccination avec gp53. Le test de cytotoxicité a été fait avec la trousse Cytotox® 96 de Proméga selon les recommandations du manufacturier. Afin de générer des cellules-cibles, des cellules NIH 3T3 (Balb/C) ont été transfectées de façon stable avec le pCMVigp53 (sélectionnées avec 400 µg/mL et maintenues avec 200 µg/mL de G-418). Ces cellules, au nombre  $1,5 \times 10^4$  par puits, ont été incubées 16 heures à 37°C. Les splénocytes ont été ajoutés selon différents ratios allant de 5:1 à 20:1 dans 100 µL final de RPMI contenant 5% FBS, 15 mM HEPES, 2 mM L-glutamine et 1 mM pyruvate. Afin de faciliter le contact cellulaire favorisant la lyse, une centrifugation de 5 minutes à 250 xg a été effectuée et les cellules ont été incubées 6 heures à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Quarante-cinq minutes avant la fin de l'incubation, 10 µL de 9% (V/V) Triton-X100 ont été ajoutés aux puits contrôles afin de déterminer la relâche maximale. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 250 xg et 50 µL du surnageant a été dosé pour l'activité de la LDH. La DO<sub>492nm</sub> a été mesurée pour toutes les réactions et le calcul du pourcentage de cytotoxicité calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{\text{Valeur expérimentale} - \text{Spontanée effectrices} - \text{Spontanée cibles}}{\text{Maximum cibles} - \text{Spontanée cibles}}$$

La valeur 'expérimentale' correspond à la relâche spontanée de LDH des cellules effectrices et cibles ainsi que la relâche de l'enzyme due à la lyse des cellules-cibles. Cette valeur a été déterminée pour tous les ratios cellules effectrices : cellules-cibles.

## **CHAPITRE 3**

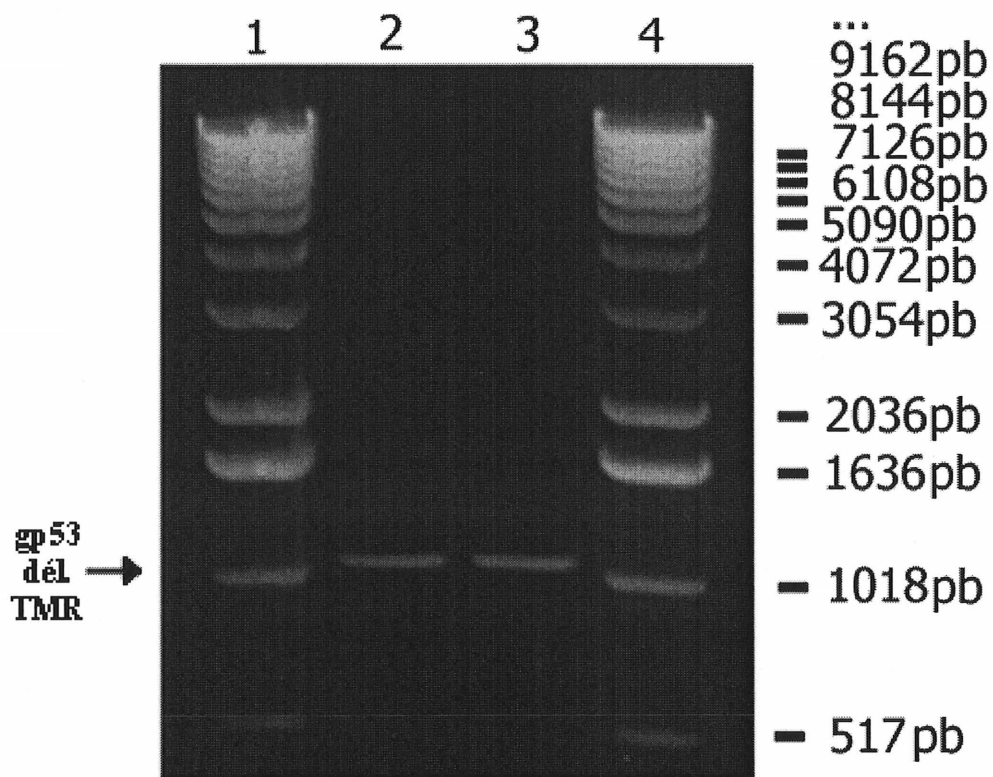
### **RÉSULTATS**

#### **3.1 AMPLIFICATION DE GP53 $\Delta$ TMR PAR PCR, CLONAGE ET SÉQUENÇAGE**

L'amplification de la portion 2414-3490 du gène gp53 de la souche 93-1 du BVDV ne comprend pas la portion C-terminale TMR du gène débutant au nucléotide 3491. La longueur de la séquence amplifiée, soit environ 1090 pb, correspond à celle prévue telle qu'observée sur gel d'agarose (figure 6). La séquence du gène tronquée obtenue par séquençage est présentée à la figure 7. En comparant cette séquence avec celles contenues dans Genbank, on constate que l'isolat 93-1 du BVDV possède plus de 99% d'homologie avec la souche Singer de type I et 96% avec la souche NADL. Compte tenu que de légères modifications se produisent lors de la répllication virale *in vitro*, on peut donc croire que l'isolat utilisé originerait directement de la souche Singer. Malheureusement, dû à des contraintes d'ordre technique, la séquence en C-terminal n'a pu être déterminée avec précision.

#### **3.2 COMPARAISON DES GÈNES CODANT POUR GP53 ET GP53 $\Delta$ TMR**

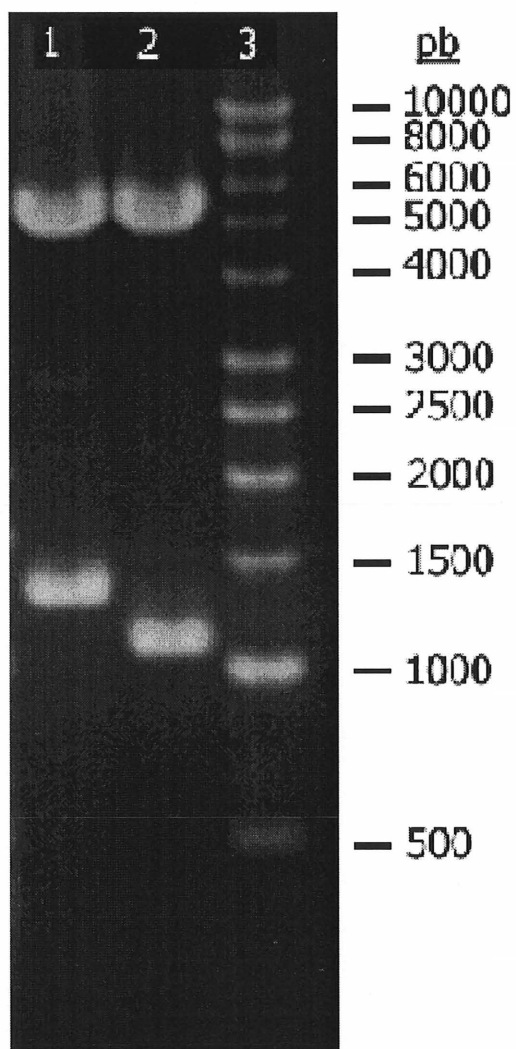
Une analyse de restriction nous a permis de comparer la longueur des inserts contenant des gènes gp53 et sa forme tronquée (figure 8). Dans le premier puits, on retrouve le fragment codant pour la forme complète de gp53 ayant 1322 pb. Dans le second puits se trouve la forme délétée de la portion transmembranaire de gp53 comprenant 1088 pb, ce qui représente une délétion de 234 nt au niveau du gène (78 acides aminés). Afin de vérifier l'intégrité des protéines encodées par le vecteur, nous avons procédé à une immunofluorescence de cellules COS-7 transfectées avec les différents vecteurs (pCMVigp53, pCMVigp53 $\Delta$ TMR et pCMVp20.62).



**Figure 6 : Amplification de gp53 $\Delta$ TMR par PCR. Les puits 1 et 4 correspondent au standard de poids moléculaire 1 kb ladder de Gibco BRL. La valeur de certaines bandes du standard est donnée en pb. On retrouve le fragment tronqué amplifié de gp53 dans les puits 2 et 3. À noter que lorsque l'on remplaçait la matrice d'ADN (le vecteur pCMVgp53) par de l'eau, nous n'obtenions aucune amplification. Cette photographie représente une électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du TBE 1X.**

1 ATGGTACAGG GCATTCTGTG GCTACTACTG ATAACAGGGG TACAAGGGGA  
 51 CTTGGATTGC AAACCTGAAT TCTCATATGC CATAGCAAGG GATGAAAGAA  
 101 TTGGTCAACT GGGGGCTGAA GGCCTTACTA CCACTTGGAA GGATTACTCG  
 151 CCTGAAATGA AACTGGAAGA CACAATGGTC ATAGCTTGGT GCAAAGATGG  
 201 TAAGTTTACG TACCTCCCAA GGTGCACGAG AGAAACCAGA TATCTCGCGA  
 251 TCTTGCATAC AAGAGCCTTA CCGACCAGTG TGGTATTCAA AAAACTTTTT  
 301 GATGGGCGAA AGCAAGAGGA TGTAGTCGAA ATGGACGACA ACTTTGAATT  
 351 TGGACTCTGC CCATGTGATG CCAAACCCAT AGTAAGAGGG AAATTCAATA  
 401 CAACGCTGCT GAACGGACCG GCCTTCCAGA TGGTATGCCC CATAGGATGG  
 451 ACAGGGACTG TAAGCTGTAT GTCATTCAAT ATGGACACCT TAGCCACAAC  
 501 CGTGATACGG ACATATAGAA GGTCCAAACC ATTCCTCAT AGGCAAGGCT  
 551 GTATCACCCA AAAGACTCTG GGGGAGGATC TCCATAACTG CATCCTCGGA  
 601 GGAAATTGGA CTTGTGTGCC TGGAGACATG CTATTATACA AAGGGGGCTC  
 651 TATTGAATCC TGCAAGTGGT GTGGTTATCA ATTTAAAGAG AGCGAGGGAC  
 701 TACCACACTA CCCCATTTGGC AAGTGTAGAT TAGAGAATGA GACTGGTTAC  
 751 AGACTAGTAG ACGATACCTC TTGTAATAGA GAAGGTGTGG CCATAGTACC  
 801 ACAAGGGACA TTACGGTGCA AGATAGGAAA AACTACTATA CAGGTCATAG  
 851 CTATGGATAC CAAACTCGGG CCTATGCCTT GCAGACCATA TGAAATAATA  
 901 TCAAGTGAGG GGCCTGTAGA AAGGACAGCG TGTACCTTCA ACTACACTAA  
 951 AACATTAAAA AATAAGTATT TTGAGCCCAG AGACAGCTAC TTCCAGCAAT  
 1001 ACATGCTAAA AGGAGAGTAT CAATACTGGT TTGACCTGGA GGTAACCGAC  
 1051 CATCACCGGG ATTACTTTGC CGAGTCCATA

**Figure 7: Séquence du gène gp53 amplifié sans la portion TMR obtenue par séquençage.**

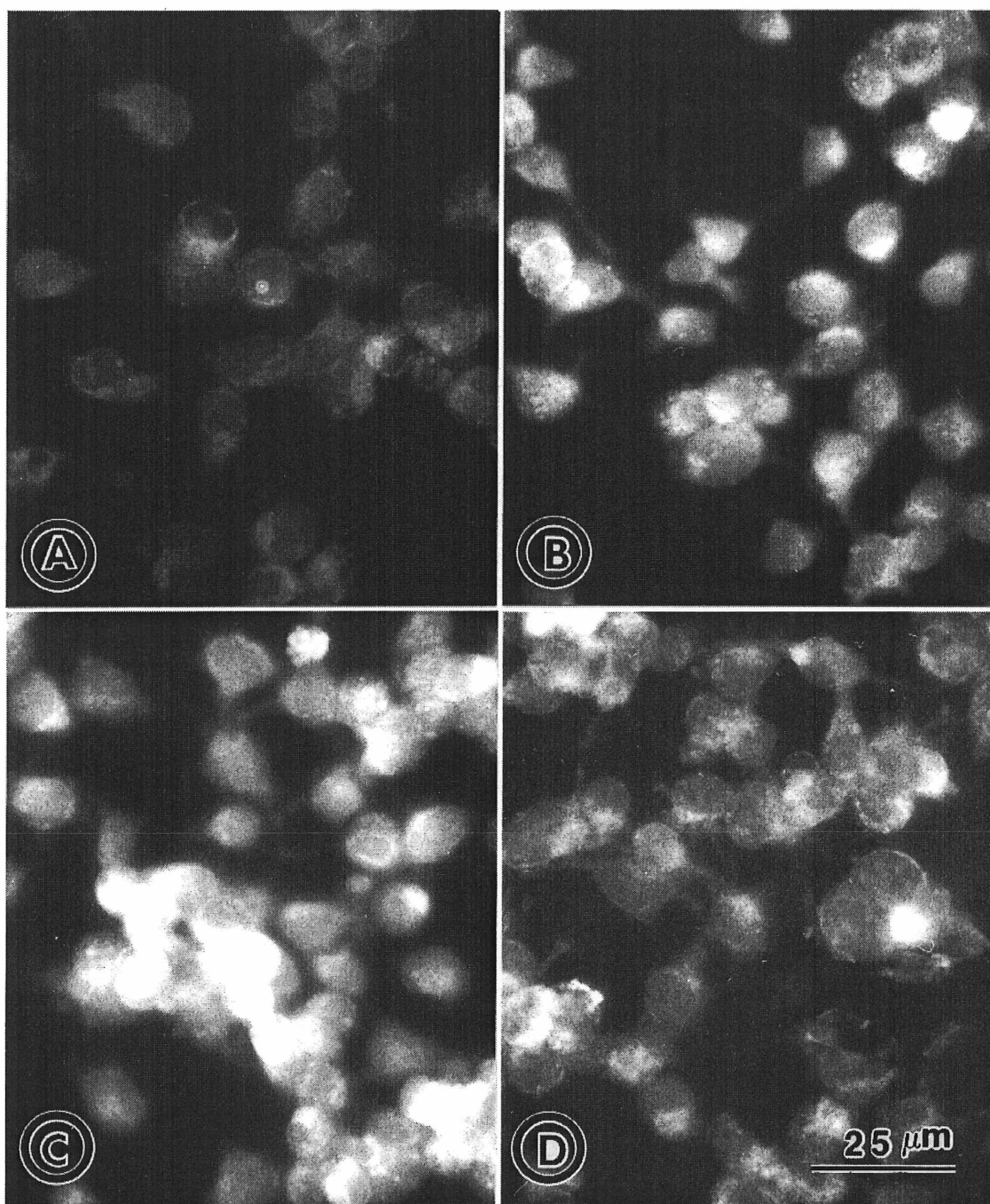


**Figure 8 : Comparaison de la longueur de l'insert codant pour gp53 de celui codant pour la forme tronquée de gp53 (Digestion *Bam* HI - *Xba* I). Dans ce gel d'agarose de 1%, on retrouve la forme complète de gp53 dans le premier alors que sa forme délétée se situe dans le puits 2. Le puits 3 comporte le marqueur de poids moléculaire Kilobase DNA Marker de Pharmacia Biotech.**

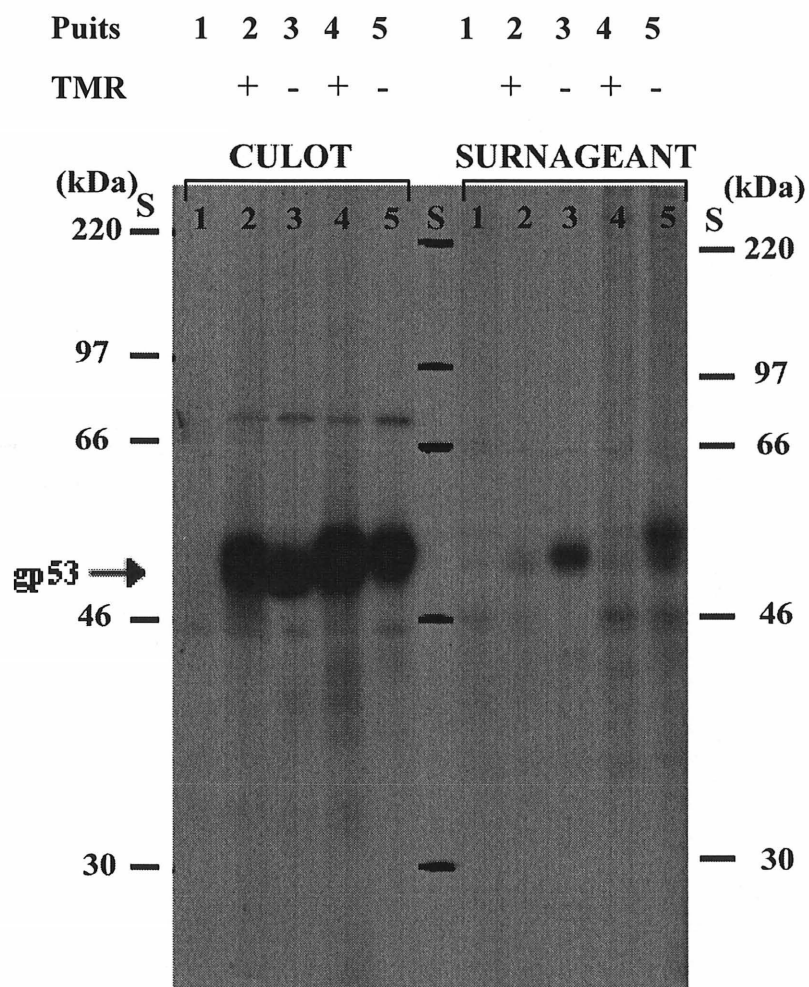
### 3.3 EXPRESSION DES CONSTRUCTIONS ET SÉCRÉTION DE GP53ΔTMR

Une transfection de cellules COS révélée par immunofluorescence a rendu possible la détection de l'expression des différentes constructions (figure 9). La présence de fluorescence plus intense dans les cellules transfectées avec pCMVigp53 (B), pCMVigp53ΔTMR (C) et pCMVp20.62 (D) par rapport à pCMVi (témoin négatif) laisse présager que les protéines sont exprimées dans la bonne conformation. Une différence significative dans l'intensité du signal pouvait être observée entre les vecteurs qui contenaient l'intron A et ceux qui n'en avaient pas (données non-montrées). Ce résultat s'explique par le fait que l'addition d'un intron stabilise le transcrit et augmente le taux d'expression (Chapman et al., 1991).

Après la démonstration de l'intégrité de gp53 et sa forme tronquée, nous avons procédé à une immunoprécipitation pour vérifier si la délétion de la portion C-terminale TMR de gp53 permettait la sécrétion de la glycoprotéine dans le milieu. On se rappelle qu'il avait été démontré auparavant, par fixation différentielle, que gp53 était exprimé à la surface cellulaire (données non-montrées). En regardant les résultats de radioimmunoprécipitation (figure 10), on remarque que la protéine gp53 et sa version tronquée possèdent des poids moléculaires apparents tournant aux alentours de 50 kDa, ce qui est très près du poids moléculaire théorique de 53 kDa pour la forme complète de la protéine. La présence de gp53ΔTMR dans le surnageant, et l'absence de gp53, suggère que la délétion de la portion transmembranaire affecte la localisation de la protéine en permettant sa sécrétion hors des cellules de mammifères, du moins *in vitro*. L'utilisation du vecteur pSec Tag, contenant une séquence signal en amont du MCS, trouve sa justification dans notre difficulté initiale à détecter la glycoprotéine dans le surnageant. On croyait que nous n'avions peut-être pas la séquence signal complète, puisqu'il avait été suggéré par Rumenapf *et al.* (1993), qu'une portion de la gp25 pourrait servir de séquence signal à gp53. Après démonstration de la sécrétion, nous étions fin prêts pour les injections et déterminer l'effet de la localisation et de la voie d'injection sur la réponse immunitaire en la caractérisant.



**Figure 9 : Immunofluorescence de cellules COS-7 transfectées avec gp53, gp53 $\Delta$ TMR et p20.62. Dans la portion A) de la figure, on retrouve des cellules transfectées avec le vecteur contrôle (pCMVi). Dans les parties B) et C) se situent les cellules transfectées avec gp53 et sa version délétée respectivement. On peut observer l'immunofluorescence de cellules transfectées avec pCMVp20.62 en D).**



**Figure 10 : Sécration de gp53 $\Delta$ TMR dans le surnageant.** Des cellules COS transfectées avec les constructions ont été radiomarquées pendant 4 heures. Après l'immunoprécipitation, les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE (10% d'acrylamide) en conditions dénaturantes. Le témoin négatif (pCMVi) se trouve dans le premier puits. On retrouve pCMVigp53 et pSECTag53 dans les puits 2 et 4 tandis que pCMVigp53 $\Delta$ TMR et pSECTag53 $\Delta$ TMR occupent les puits 3 et 5 respectivement.



## **CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE HUMORALE**

La standardisation d'un test ÉLISA fut faite dans le but de détecter la présence d'anticorps dirigée contre le BVDV. De cette façon, il a été possible de caractériser l'effet de la localisation et de la voie d'injection sur la réponse humorale envers gp53 par des études de séroconversion, de cinétique de production des immunoglobulines et de détermination des titres d'anticorps après 15 semaines. Par la suite, une analyse des séroneutralisation ainsi que des isotypes furent utilisés pour déterminer la production d'anticorps neutralisants et donner un indice sur le type de réponse cellulaire obtenue.

### **3.4 STANDARDISATION D'UN TEST ÉLISA POUR DÉTECTER LES PROTÉINES DU BVDV**

Dans le but de caractériser la réponse humorale générée envers les protéines du BVDV suite à l'administration des plasmides, un test ÉLISA fut mis au point. Comme la vaccination à l'ADN ne génère que de modestes titres d'anticorps dans la majorité des cas, il est primordial de posséder un essai sensible. La sensibilité d'un essai se définit selon le signal qu'il produit par rapport au bruit de fond. Plus ce ratio est élevé, meilleure est la sensibilité. C'est pourquoi plusieurs paramètres de l'ÉLISA ont fait l'objet de standardisation. Parmi les paramètres optimisés, on note le type de plaque, le choix de l'agent de blocage ainsi que les dilutions d'anticorps secondaire et du conjugué streptavidine-peroxydase.

#### ***3.4.1 Type de plaque***

Des essais ont été faits sur trois types de microplaques, Polysorp (Nunc), Maxisorp (Nunc) et Microtest III (Falcon), pour la détection des anticorps dirigés contre le BVDV à partir de l'extrait viral (tableau 4). Alors que les plaques Microtest III (Falcon) et Maxisorp

sont des plaques qui lient les protéines hydrophiles et hydrophobes, la plaque Polysorp est spécialement conçue pour attacher les molécules hydrophobes. Comme la protéine gp53 est une protéine transmembranaire et possède plusieurs résidus de nature hydrophobe, on s'attendait à ce que la microplaque Polysorp constitue un bon choix. En effet, c'est cette plaque qui procure la meilleure sensibilité de détection puisqu'elle génère le meilleur ratio signal versus bruit de fond. Le BSA semble à priori la protéine de choix pour le blocage de ce type de plaque avec un impressionnant ratio signal/bruit de fond de 43,26. Malgré le fait que la plaque Microtest III de Falcon émet le meilleur signal, elle donne également des bruits de fond élevés puisqu'elle a tendance à former plusieurs liaisons non-spécifiques. En ce qui concerne la plaque Maxisorp, seul le lait en poudre donne des résultats convenables. Toutefois, le signal émis est relativement faible avec une  $DO_{450nm}$  nette de seulement 0,337.

**Tableau 4 : Sélection du type de plaque pour l'ÉLISA pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV.**

<b>Type de plaque</b>	<i>Agent de blocage</i>	<i>Ratio signal/bruit de fond</i>	<i>DO<sub>450nm</sub> nette (Avec Ag – sans Ag)</i>
<b>Microtest III (Falcon)</b>	Lait 3%	7,28	0,344
	BSA 3%	9,34	0,670
	Gélatine 3%	7,34	0,176
<b>Polysorp (Nunc)</b>	Lait 3%	19,69	0,323
	BSA 3%	43,26	0,592
	Gélatine 3%	12,01	0,157
<b>Maxisorp (Nunc)</b>	Lait 3%	22,08	0,337
	BSA 3%	4,58	0,450
	Gélatine 3%	5,31	0,220

### ***3.4.2 Agent de blocage***

Le blocage des sites inoccupés par l'antigène au fond de la plaque forme une mesure très importante afin d'éliminer les liaisons non-spécifiques des anticorps à la matrice solide. Dans les conditions examinées, le tween 20, un détergent, s'est avéré le meilleur agent de blocage pour la plaque Polysorp puisqu'il donne une plus grande sensibilité (tableau 5). La caséine pourrait également s'avérer un choix judicieux pour la saturation. Tant qu'au PBS, on lui attribue la pire performance car il ne sature en rien la surface d'adsorption hydrophobe et permet l'adhérence des outils de détection engendrant le signal. Son rapport signal/bruit de fond est inférieur à 1 puisque dans le contrôle sans antigène, aucun site de liaison n'a préalablement été saturé en protéines. C'est pourquoi plus d'anticorps pourront se fixer au fond de la plaque, et produire un signal, comparativement au puits avec antigène qui a déjà fixé l'extrait viral. Fait intéressant à noter est que la concentration de protéines affecte la qualité de l'essai (tableau 5). En effet, une augmentation de la concentration en protéines dans le tampon de blocage et de dilution atténue non seulement le signal, mais aussi la sensibilité de l'immunoessai. Peut-être qu'une trop grande quantité de protéines de blocage masque partiellement certains épitopes de l'antigène reconnus par l'anticorps. De plus, l'utilisation d'un tampon de dilution pour les anticorps plus concentré en protéines cause probablement une « compétition » entre les deux types de protéines pour l'accessibilité des épitopes. Cela entraînerait une diminution à la fois du signal et du bruit de fond. Il serait intéressant de vérifier cette dernière hypothèse en essayant différentes concentrations de protéines dans le tampon de dilution.

### ***3.4.3 Dilution de l'anticorps secondaire et du conjugué***

L'évaluation de la dilution optimale de l'anticorps secondaire a été faite du signal fourni par le sérum de souris immunisé par rapport à celui d'un sérum murin préimmun (tableau 6) puisque le bruit de fond avec le contrôle sans antigène présentait peu de variations. Le choix de la dilution 1/16000 d'anticorps secondaire au détriment de la dilution

**Tableau 5 : Sélection de l'agent de blocage pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV par ÉLISA.**

Agent de blocage	Pourcentage (%)	Ratio signal/bruit de fond	DO <sub>450nm</sub> nette
BSA	1	23,40	0,880
	3	23,34	0,811
	5	21,80	0,722
Gélatine bactérienne	1	16,05	0,718
	3	13,20	0,655
Lait en poudre	1	25,85	0,827
	3	21,75	0,643
	5	17,53	0,574
Caséine	1	31,60	0,848
Tween 20	0,05	34,64	0,786
PBS	-	Moins de 1	- 0,028

1/40000, qui donnait une sensibilité légèrement plus élevée (1,8% plus sensible), se fonde sur le très faible signal produit par la dilution 1/40000. En effet, la dilution 1/16000 génère un signal supérieur de 47% (0,477 vs 0,255) à celui conféré par la dilution 1/40000. Procurant un signal équivalent à la dilution 1/2000, la dilution 1/16000 est 64% plus sensible que cette dernière et constitue par conséquent la dilution de choix. En ce qui a trait au conjugué, la dilution 1/4000 fût adoptée (tableau 7). Une fois l'essai standardisé pour caractériser la réponse humorale, il était maintenant possible de déterminer l'effet de la localisation et de la voie d'injection de gp53 sur la réponse humorale contre la protéine.

**Tableau 6 : Détermination de la dilution d'anticorps secondaire optimale pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV par ÉLISA.**

Dilution Ac secondaire	DO <sub>450nm</sub> immunisé	DO <sub>450nm</sub> préimmun	DO <sub>450nm</sub> nette	Ratio signal/bruit de fond
1/500	1,224	0,630	0,594	1,94
1/1000	1,040	0,510	0,530	2,04
1/2000	0,824	0,350	0,474	2,35
1/4000	0,722	0,288	0,434	2,51
1/8000	0,654	0,234	0,420	2,79
1/12000	0,647	0,191	0,456	3,39
1/16000	0,644	0,167	0,477	3,86
1/20000	0,504	0,142	0,362	3,55
1/40000	0,342	0,087	0,255	3,93

**Tableau 7 : Détermination de la dilution optimale du complexe streptavidine-HRP pour la détection des anticorps contre les protéines du BVDV par ÉLISA.**

Dilution strep.-HRP	DO <sub>450nm</sub> immunisé	DO <sub>450nm</sub> préimmun	DO <sub>450nm</sub> nette	Ratio signal/bruit de fond
1/500	0,588	0,187	0,401	3,14
1/1000	0,580	0,167	0,413	3,47
1/2000	0,584	0,142	0,442	4,11
1/4000	0,555	0,129	0,426	4,30
1/8000	0,369	0,098	0,271	3,77

### **3.5 EFFET DE LA LOCALISATION DE GP53 SUR LA RÉPONSE HUMORALE**

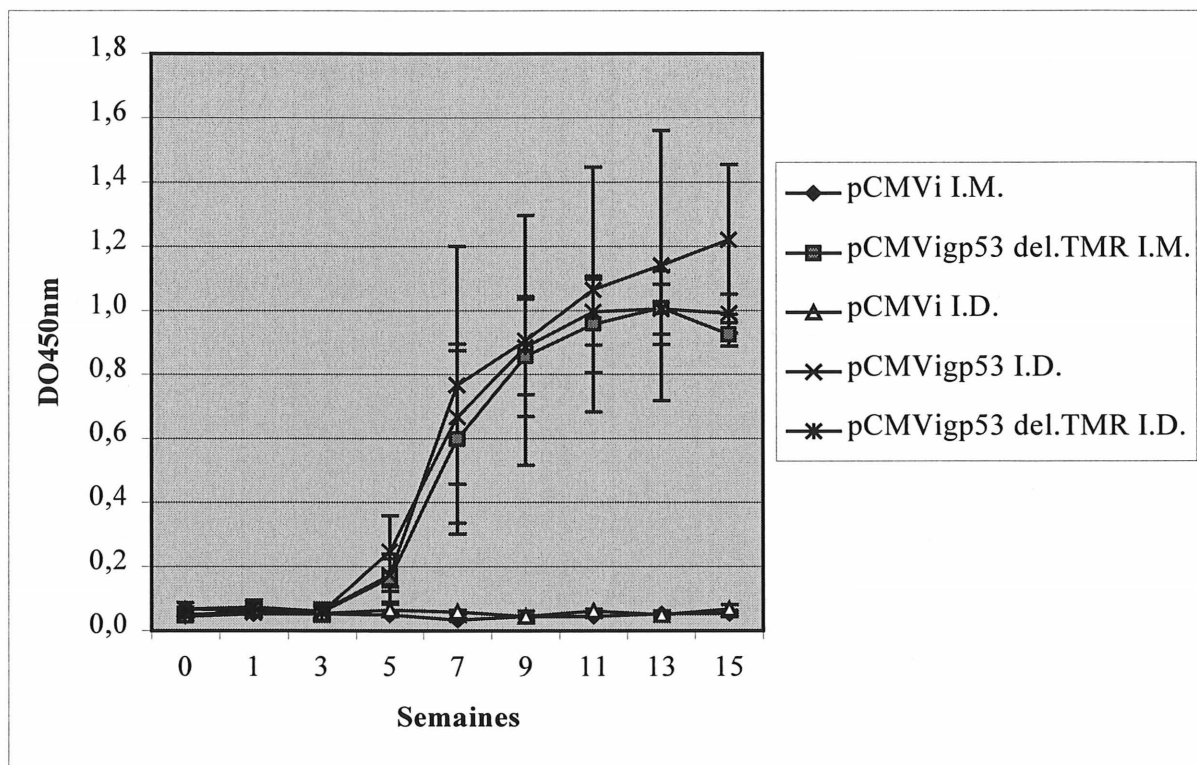
Dans une expérience préliminaire, nous avons déterminé que la protéine gp53 se trouvait à la surface cellulaire une fois exprimée à l'intérieur de cellules eucaryotes. Il a également été démontré, par immunoprécipitation, que la délétion de sa portion TMR permettait la sécrétion de la protéine dans le milieu extracellulaire.

Des souris BALB/c (haplotype H-2<sup>d</sup>) ont été immunisées avec 100 µg de plasmide dans les quadriceps (voie i.m.) aux jours 0, 14 et 28. La réponse humorale (IgG) spécifique à gp53 a par la suite été mesurée par ÉLISA 1,3,5,7,9,11,13 et 15 semaines après l'injection initiale (tableau 8 et figure 11). Une dichotomie s'observe dans la production d'anticorps selon la localisation de la protéine gp53. En effet, seule la forme sécrétée de la protéine permet la production d'anticorps au-dessus de notre seuil de détection suite à l'injection des plasmides dans le muscle. Cette divergence s'explique par l'atteinte des prérequis pour l'activation des cellules B à produire des immunoglobulines. Normalement, les cellules B requièrent deux signaux d'activation pour la production d'anticorps. Le premier est la formation d'un complexe sIg-Ag alors que le second provient des médiateurs protéiques sécrétés par les cellules TCD4<sup>+</sup> suite à la présentation de l'antigène via le CMH II. Dans le cas de gp53ΔTMR, la sécrétion de la protéine permet à la fois la fixation de l'antigène sur les récepteurs sIg des lymphocytes B et la présentation via le CHM II suite à la prise et au processing de l'antigène par les APC. En ce qui concerne la version naturelle de gp53, la glycoprotéine virale reste solidement ancrée à la surface cellulaire des myocytes, laissant peu de protéines s'échapper en circulation. Malgré le fait que la présentation de l'antigène peut se faire par la transfection directe des APCs, une quantité insuffisante de récepteurs sIg de cellule B seront engagés pour conférer le premier signal d'activation, faute d'antigène intact. C'est donc la faible dose d'antigène intact disponible pour stimuler l'activation des cellules B qui constitue la cause de la faible immunité humorale contre gp53 par la voie intramusculaire. L'administration de l'ADN plasmidique de gp53 avec un adjuvant (fourni

**Tableau 8: Séroconversion des souris contre les protéines du BVDV après vaccination à l'ADN.**

<b>Groupe d'injection</b>	<b>Plasmide</b>	<b>Voie</b>	<b>Nombre de séropositifs <u>semaine 3</u></b>	<b>Nombre de séropositifs <u>semaine 5</u></b>	<b>Nombre de séropositifs <u>semaine 7</u></b>	<b>Nombre de séropositifs <u>semaine 9</u></b>
<b>A</b>	<b>pCMVi</b>	<b>I.M.</b>	<b>aucun (contrôle)</b>	<b>Aucun (contrôle)</b>	<b>Aucun (contrôle)</b>	<b>Aucun (contrôle)</b>
<b>B</b>	<b>pCMVigp53</b>	<b>I.M.</b>	<b>0/6</b>	<b>0/6</b>	<b>0/6</b>	<b>0/6</b>
<b>C</b>	<b>pCMVigp53 tronqué</b>	<b>I.M.</b>	<b>0/6</b>	<b>2/6</b>	<b>4/6</b>	<b>5/6</b>
<b>D</b>	<b>pCMV p.20.62</b>	<b>I.M.</b>	<b>2/6</b>	<b>1/4</b>	<b>0/4</b>	<b>1/4</b>
<b>E</b>	<b>pCMVi</b>	<b>I.D.</b>	<b>aucun (contrôle)</b>	<b>Aucun (contrôle)</b>	<b>Aucun (contrôle)</b>	<b>Aucun (contrôle)</b>
<b>F</b>	<b>pCMVigp53</b>	<b>I.D.</b>	<b>1/6</b>	<b>3/6</b>	<b>4/6</b>	<b>5/6</b>
<b>G</b>	<b>pCMVigp53 tronqué</b>	<b>I.D.</b>	<b>1/6</b>	<b>3/6</b>	<b>4/6</b>	<b>5/6</b>
<b>H</b>	<b>pCMV p.20.62</b>	<b>I.D.</b>	<b>0/6</b>	<b>0/5</b>	<b>0/5</b>	<b>0/5</b>
<b>I</b>	<b>pCMVigp53 +adjuvant</b>	<b>I.M.</b>	<b>0/5</b>	<b>1/5</b>	<b>0/4</b>	<b>0/4</b>

par le Dr. Youssef Elhazary de l'Université de Montréal) ne change en rien la réponse humorale montée par cette construction (tableau 8, groupe I).



**Figure 11 : Effet de la localisation et de la voie d'injection sur la cinétique de production des anticorps dirigés contre gp53 suite à la vaccination à l'ADN. La cinétique a été faite avec une dilution du sérum de 1/100.**



Quelle que soit la voie d'injection, la localisation de gp53 affecte les titres d'anticorps développés (tableau 9). Non seulement la forme sécrétée (53ΔTMR) génère-t-elle de meilleurs titres d'immunoglobulines que la forme transmembranaire (gp53), mais elle provoque également une augmentation de la fréquence de séroconvertants présentant un titre appréciable ( $>1/50$ ). Grâce à la sécrétion de gp53 dans le milieu, pCMVigp53ΔTMR permet une amplification de la réponse humorale puisqu'il augmente la dose d'antigène intact pour interagir avec les cellules B. Mentionnons que la réponse humorale est de longue durée puisque le titre d'anticorps n'a pratiquement pas diminué, et cela 6 mois après le début de l'expérience.

### **3.6 EFFET DE LA VOIE D'INJECTION SUR LA RÉPONSE HUMORALE CONTRE GP53**

On observe également des différences au niveau de la réponse humorale selon la voie d'immunisation. En outre, les souris injectées par la voie intradermique séroconvertissent plus tôt que leurs compatriotes de la voie intramusculaire (figure 11). En effet, on y retrouve deux souris qui développent des anticorps dès la troisième semaine après la première vaccination (vs 5 semaines), soit une semaine après le premier rappel. Cette disparité trouve une justification dans les types cellulaires transfectés selon la voie d'injection, ce qui affecte la présentation de l'antigène. Contrairement à l'injection intramusculaire, la transfection des APC se fait dans une proportion plus importante lors de l'injection dans la peau, permettant ainsi la présentation directe de l'antigène au système immunitaire. L'administration d'ADN plasmidique dans le muscle transfecte majoritairement des myocytes ( $\neq$  APC), cellules qui par la suite doivent relâcher la protéine pour la prise et la présentation via le CMH II par les APC. Comme la production d'antigène par les myocytes atteint un maximum après 7 jours (Manthorpe *et al.*, 1993), la présentation de l'antigène est retardée par rapport à l'autre voie. C'est pourquoi la séroconversion est plus lente pour la voie intramusculaire. En général, la cinétique de production des anticorps des groupes séroconvertis augmente lentement jusqu'à la 13<sup>e</sup> semaine pour y atteindre un plateau. On observe donc une cinétique de production

**Tableau 9: Titres d'anticorps totaux des souris séroconverties 15 semaines après l'injection initiale.**

<b>Souris</b>	<b>Plasmide et voie</b>	<b>TITRE</b>
C0	igp53ΔTMR I.M.	1/2000
C1R	igp53ΔTMR I.M.	1/8000
C1L	igp53ΔTMR I.M.	1/300
C2R	igp53ΔTMR I.M.	1/4000
F0	igp53 I.D.	1/3000
F1L	igp53 I.D.	1/900
F1R1L	igp53 I.D.	1/1400
G0	igp53ΔTMR I.D.	1/800
G1R	igp53ΔTMR I.D.	1/2500
G1L	igp53ΔTMR I.D.	1/600
G1R1L	igp53ΔTMR I.D.	1/2800
G2L	igp53ΔTMR I.D.	1/7000

Note: Les souris qui ne sont pas inscrites dans le tableau possèdent des titres d'environ 1/50.

classique pour la vaccination à l'ADN, soit une production d'anticorps lente et progressive atteignant un plateau aux alentours de la 12<sup>e</sup> semaine (Kowalczyk et Ertl, 1999). Malgré ce court délai initial entre les voies d'injection pour la production d'immunoglobulines, on retrouve la même finalité chez les groupes séroconvertis, soit 5 souris répondantes sur 6 après 9 semaines (tableau 8).

Une autre différence apportée par la voie d'injection est la production d'anticorps par la forme naturelle de gp53 lorsqu'injectée par la voie intradermique (figure 11). Encore une fois, cette différence s'explique par les différents types cellulaires transfectés selon la voie.

Le cas de l'injection dans le quadriceps ayant déjà été traité (voir section précédente), l'emphase sera mis sur l'administration de l'ADN codant pour gp53 dans le derme pour l'activation des cellules B. Pour l'injection I.D. de gp53, le second signal d'activation des lymphocytes B provient de la transfection directe des APC qui présentent l'antigène aux cellules T au niveau des nodules lymphatiques. En ce qui concerne le premier signal d'activation, il pourrait provenir soit de la transfection directe des cellules B (interaction sIg et gp53 à la surface membranaire), de la relâche plus importante de gp53 par les kératinocytes ou encore par un tout autre mécanisme. Mais une chose est certaine, la voie intradermique induit la synthèse d'une quantité plus importante d'antigène intact que la voie I.M. pour l'interaction avec les le sIg des cellules B (premier signal d'activation).

### **3.7 ABSENCE D'ANTICORPS CONTRE P20, P14, GP48 ET GP25**

En ce qui a trait aux souris immunisées avec le plasmide pCMVp20.62, elles ne semblent pas avoir produit d'anticorps. Malgré que le tableau 8 suggère que deux souris auraient séroconvertis, le sérum préimmun de ces souris donnait un bruit de fond plus élevé que la normale. De plus, le signal obtenu par ÉLISA avec leur sérum ne s'établissait pas constamment au-dessus des deux déviations standards de la moyenne des témoins. Il faut quand même noter que le test ÉLISA n'a pas été standardisé en fonction des antigènes contenus dans ce vecteur. Par contre, les protéines gp25 et gp48 sont des protéines membranaires et par conséquent les conditions utilisées (la plaque Polysorp lie les protéines hydrophobes) devraient être satisfaisantes. De plus, les deux autres protéines (p20 et p14) ne sont pas situées à la surface du virus et donc ne sont d'aucun intérêt dans l'immunité humorale contre le BVDV. Comme la gp25 ne constitue pas la cible d'anticorps neutralisants, on croit que cette protéine serait enfoncée dans la membrane lipidique et ne jouerait pas un grand rôle dans la neutralisation du virus (Potgieter, 1995). Malgré le fait que gp48 ne produit que de faibles titres d'anticorps neutralisants comparé à gp53 (van Rijn *et al.*, 1996), son rôle dans la pathogénèse rend l'immunité humorale contre cette protéine intéressante. Puisque l'amplitude de l'immunité générée par la vaccination à l'ADN n'est pas

très importante, il est possible que gp48 n'ait pas induit une réponse au-dessus de la limite de détection de l'immunoessai. D'autre part, l'injection d'une construction codant pour 4 gènes dans un même plasmide peut provoquer une certaine compétition antigénique entre les gènes, diminuant ainsi le nombre de complexes CMH II/peptide antigénique de gp48 à la surface des APC pour la présentation. La présence d'une trop faible quantité de complexes distincts (compétition des différents peptides pour les molécules de CMH II) empêcherait l'activation des cellules T, faute de l'atteinte du seuil minimal de stimulation, et donc l'initiation de la réponse immunitaire spécifique. Une autre explication de l'absence de réponse humorale contre gp48 est que cette protéine induit l'apoptose des lymphocytes et donc provoque l'immunosuppression (Bruschke *et al.*, 1997a).

### **3.8 PRODUCTION D'ANTICORPS NEUTRALISANTS**

Les anticorps capables de neutraliser l'infection virale jouent parfois un rôle important dans l'immunité protectrice, puisqu'ils inhibent l'infection virale. Les tests de séroneutralisation présentent des titres d'anticorps neutralisants de 1/10 pour certaines souris immunisées avec pCMVigp53ΔTMR par la voie i.m. (tableau 10). De plus, deux souris sur trois présentent des titres d'anticorps neutralisants appréciables contre le virus de type II. Comme les anticorps neutralisants sont très sensibles au gel/dégel et que les échantillons ont fait l'objet de ces changements de température importants à trois reprises, les résultats provenant des études de neutralisation ne sont pas aussi concluants qu'ils devraient l'être. Toutefois, quelques corollaires peuvent quand même en être tirés. En effet, on peut remarquer qu'il existe une corrélation distincte entre le titre d'anticorps et la présence d'anticorps capables de séroneutraliser le virus de type II. Plus le titre est élevé, plus le sérum possède la capacité de neutraliser le BVDV 125, la souris possédant un titre inférieur (C1L) ne pouvant neutraliser que le virus Singer de type I. Ces résultats soulèvent l'existence d'une identité partielle entre les épitopes retrouvés chez la souche Singer et 125. Dans ce cas, une forte production d'immunoglobulines dirigées contre un des deux virus pourrait neutraliser

**Tableau 10 : Titres d'anticorps neutralisants contre les souches Singer et 125 du BVDV  
13 semaines après la première injection.**

<i>Souris</i>	<b>Titre d'anticorps neutralisants</b>	
	<i>Contre la souche Singer (type I)</i>	<i>Contre la souche 125 (type II)</i>
C0	1/10	1/10
C1R	1/10	1/10
C1L	1/10	—

l'autre. Même si l'affinité est moins bonne, il y aurait compensation par le nombre.

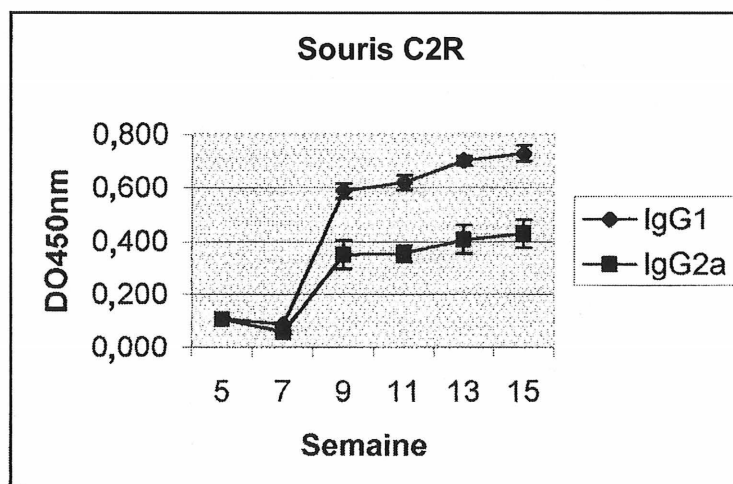
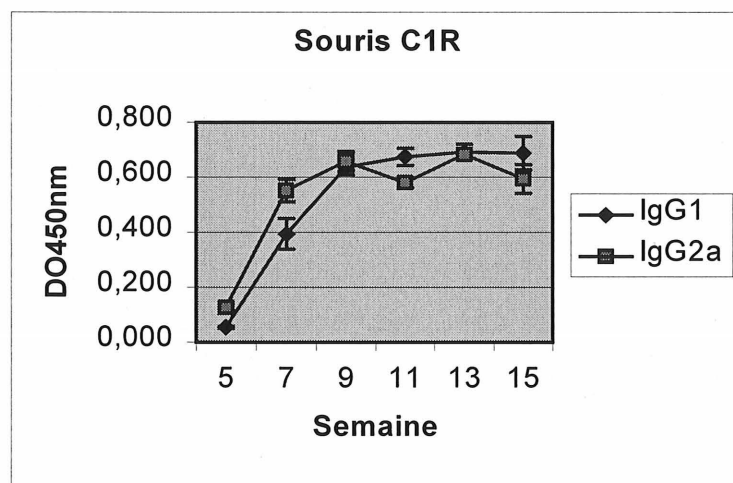
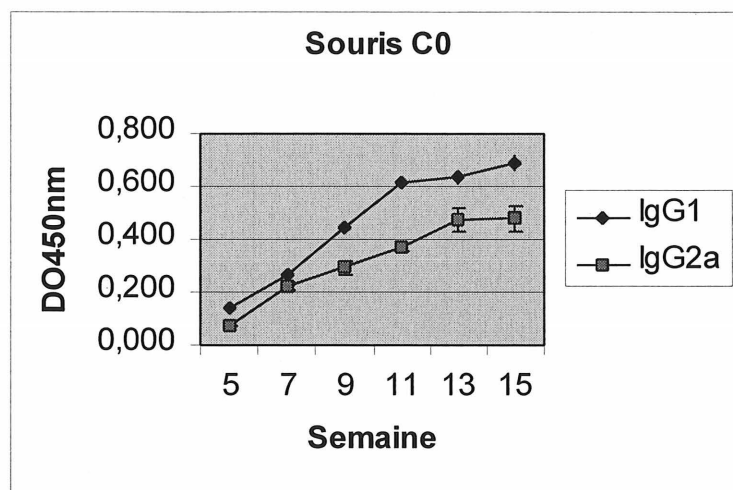
### **3.9 PRODUCTION MIXTE DES ISOTYPES D'IMMUNOGLOBULINES PAR GP53**

Les isotypes d'anticorps produits reflètent normalement le type de réponse T auxiliaire générée par la vaccination. La production de l'immunoglobuline IgG1 représente une réponse de type Th2 due à la nécessité de la présence d'IL-4 pour favoriser le changement de classe (class switch) vers la formation de cet isotype, tandis que la présence d'IgG2a, relevant d'une réponse de type Th1, requiert l'IFN- $\gamma$  pour la conception de cette chaîne lourde d'immunoglobuline. On retrouve un mélange des deux isotypes, IgG2a et IgG1, parmi la majorité des souris séroconverties (tableau 11), ce qui est caractéristique des antigènes sécrétés injectés dans de la saline par vaccination à l'ADN (Feltquake, 1998). Une corrélation distincte s'observe entre le ratio IgG1/IgG2a versus le titre d'anticorps obtenu. En effet, plus le ratio est faible, plus le titre d'anticorps est élevé. Les souris ayant un rapport IgG1/IgG2a supérieur à 5, synonyme du développement d'une réponse Th2, développent les titres d'anticorps les plus modestes. Afin de déterminer si ces faibles titres provenaient d'un changement ('shift') dans la réponse humorale, une analyse de la cinétique de production des isotypes a été effectuée. Peu importe l'isotype produit, la cinétique de leur production est relativement similaire pour les souris ayant obtenu des titres élevés (C0, C1R, C2R, F0,

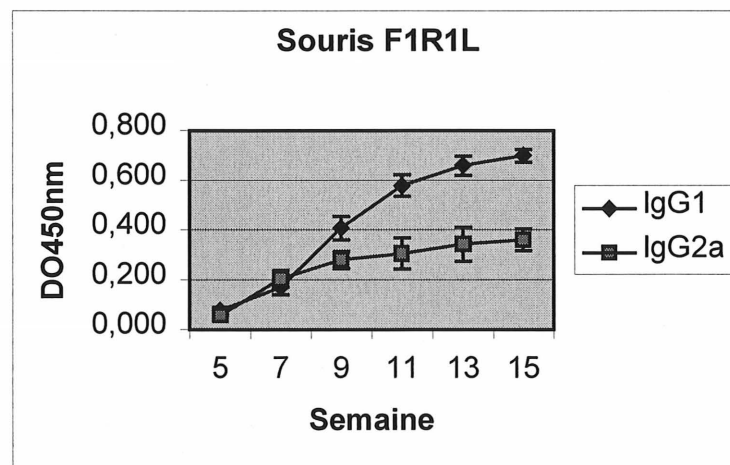
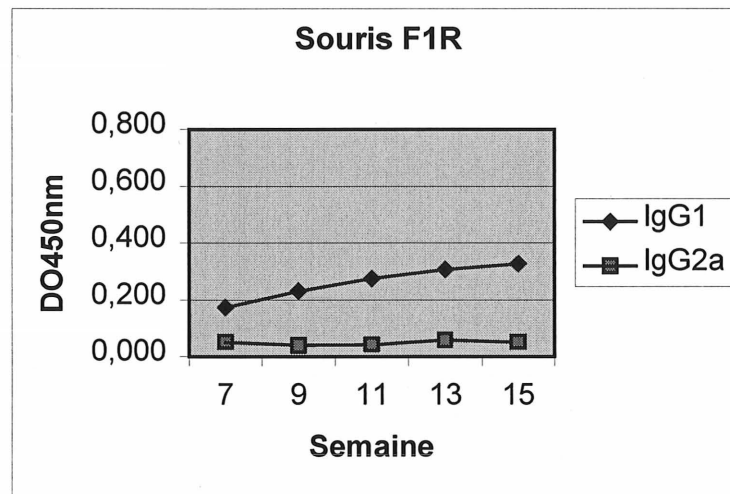
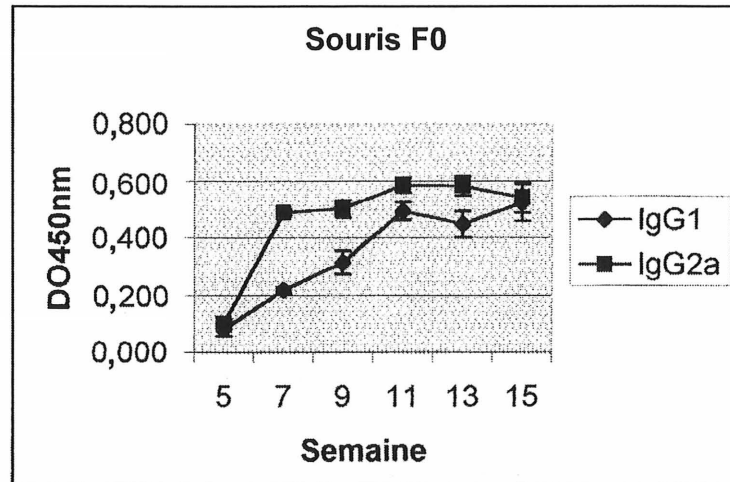
**Tableau 11 : Isotypes des anticorps produits par les souris séroconverties 15 semaines après l'injection initiale.**

Souris	Ratio IgG1/IgG2a	Type de réponse	Titre
C0	1,33	Mélange	2000
C1R	1,11	Mélange	8000
C1L	9,22	Th2	300
C2R	1,70	Mélange	4000
C2L	11,4	Th2	50
F0	0,85	Mélange	3000
F1L	1,49	Mélange	900
F1R	6,41	Th2	50
F1R1L	2,06	Mélange	1400
F2L	9,62	Th2	50
G0	5,61	Th2	800
G1R	1,50	Mélange	2500
G1L	18,33	Th2	600
G1R1L	2,48	Mélange	2800
G2R	1,59	Mélange	7000

F1R1L, G1R, G1R1L et G2L) (figure 12). Toutefois, il y a prépondérance de l'isotype IgG1 sur l'isotype IgG2a sauf dans le cas de F0 où ils se croisent à la 15<sup>e</sup> semaine. Puisque la cinétique de production des deux isotypes se côtoie, on ne peut accepter l'hypothèse du shift. Afin de déterminer si cette hypothèse est véritablement fausse, il faudrait reprendre les séries d'injection sans refaire les rappels d'injection pour un groupe et refaire un rappel pour un autre groupe. De cette façon, il serait possible de vérifier si une seule injection induit la formation principalement d'IgG1 à long terme puisque l'ADN lui-même induit la production d'IFN- $\gamma$  (via motifs CpG) et favorise la transition vers la formation d'IgG2a. Dans notre cas, les isotypes ne donnent donc pas d'indice sur le type de réponse cellulaire.

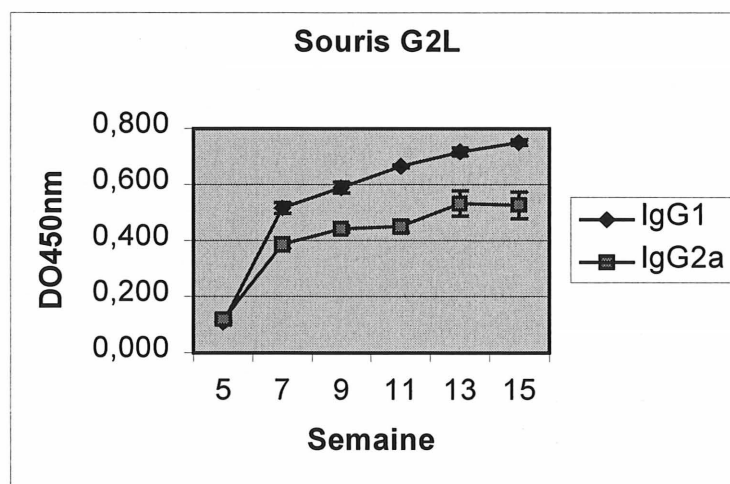
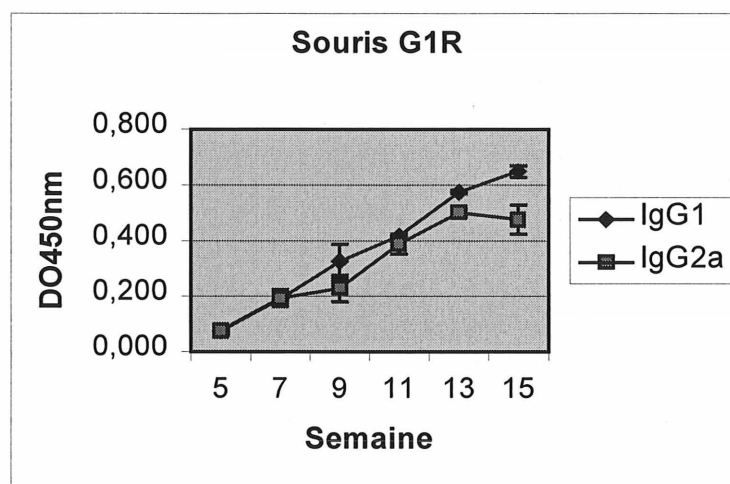
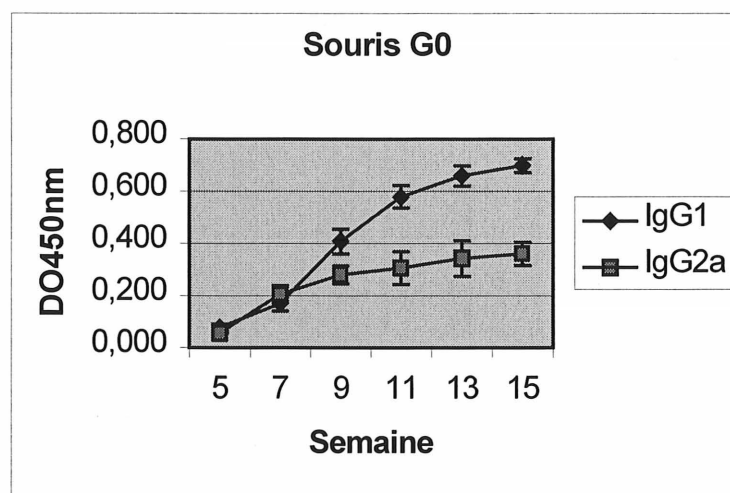


**Figure 12 : Cinétique de production des isotypes IgG1 et IgG2a dirigés contre le BVDV selon différentes souris séroconverties vaccinées à l'ADN.**



**Figure 12 (suite I) : Cinétique de production des isotypes IgG1 et IgG2a dirigés contre le BVDV selon différentes souris séroconverties vaccinées à l'ADN.**





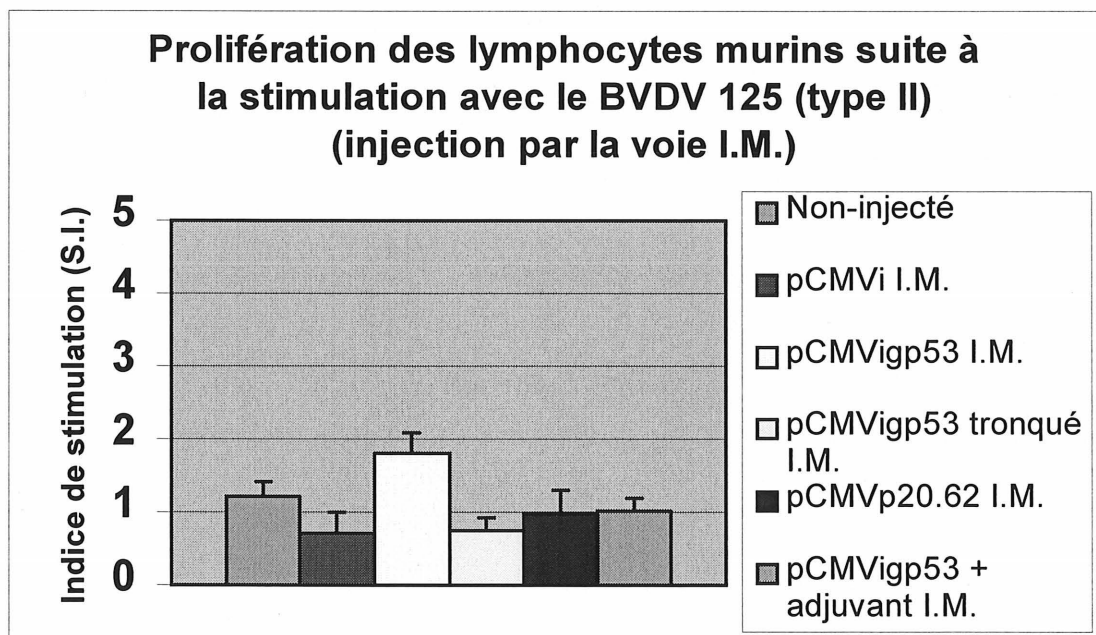
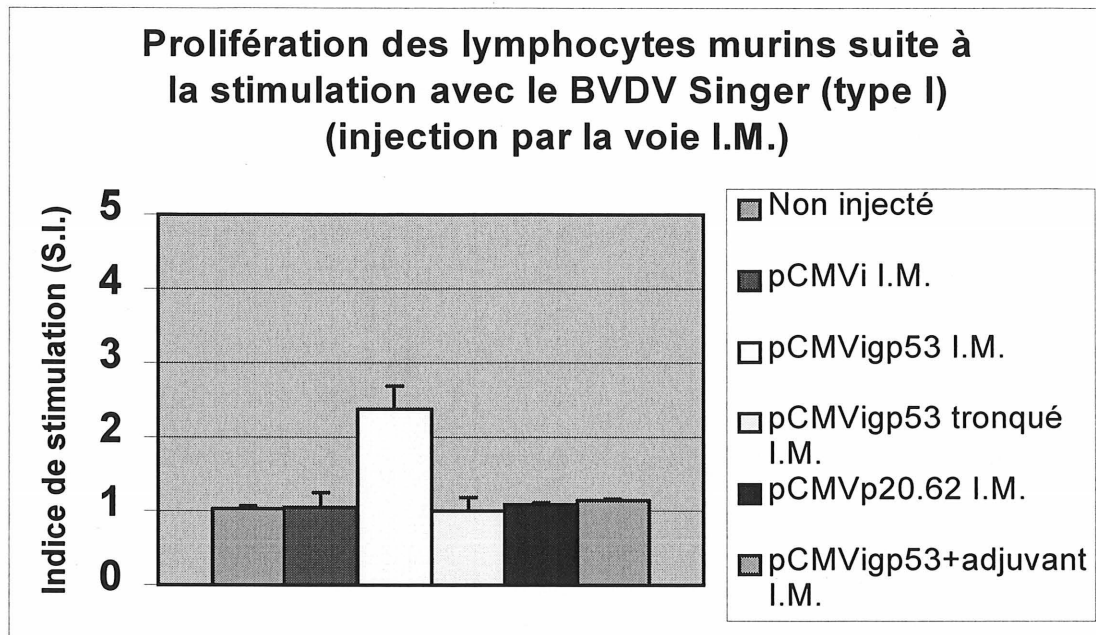
**Figure 12 (suite II) : Cinétique de production des isotypes IgG1 et IgG2a dirigés contre le BVDV selon différentes souris séroconverties vaccinées à l'ADN.**

## **CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE**

La mise en culture des cellules de la rate des souris immunisées nous ont permis de caractériser la réponse cellulaire spécifique contre le BVDV. La mesure de la prolifération des cellules T suite à la stimulation antigénique (BVDV) permet de déterminer si l'immunisation génère une réponse cellulaire mémoire. Le dosage des cytokines IL-2, IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  fut utilisé pour caractériser le type de réponse cellulaire spécifique obtenu. Finalement, un test de cytotoxicité a été conduit pour essayer de détecter une réponse CTL contre gp53. L'effet de la localisation de gp53 ainsi que la voie d'injection sur ces paramètres fut évalué et comparé. De plus, la réponse cellulaire contre les protéines p20, p14, gp25 et gp48, suite à l'immunisation à l'ADN dans un seul et unique vecteur, a été caractérisée.

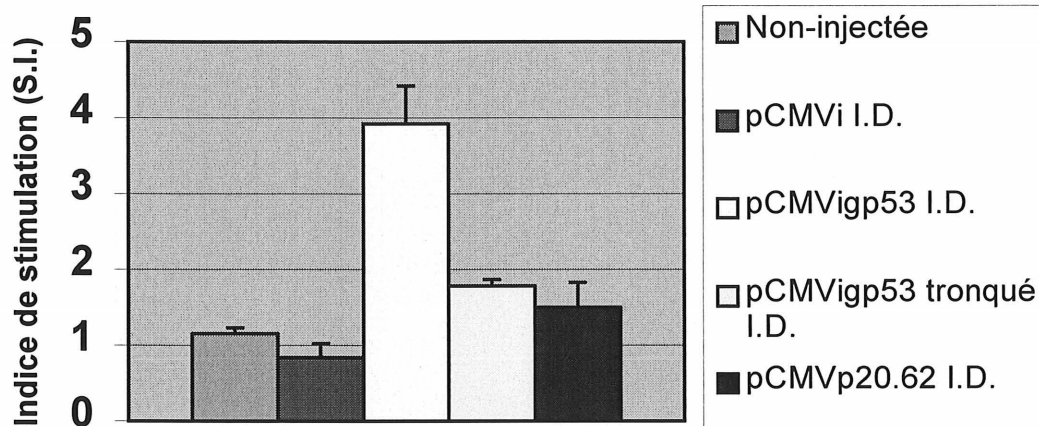
### **3.10 EFFET DE LA LOCALISATION DE GP53 SUR LA RÉPONSE CELLULAIRE**

La localisation de gp53 semble à priori avoir une influence importante sur la réponse proliférative des cellules T. En effet, la version complète de gp53 génère une réponse lymphoproliférative environ deux fois supérieure à la forme tronquée du gène peu importe la voie d'injection (figure 13 et 14). Toutefois, l'augmentation de la dose d'antigène disponible en circulation induite par gp53 $\Delta$ TMR par rapport à gp53 aurait dû favoriser la présentation par le CMH II et donc la prolifération, or tel n'est pas le cas. Par conséquent, le faible niveau de prolifération obtenu avec la glycoprotéine sécrétée évoque la présence d'un épitope T dans l'extrémité carboxy-terminale de la glycoprotéine virale. Cela expliquerait les très faibles niveaux de prolifération obtenus avec la protéine sécrétée. La production d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes stimulés corrobore également l'hypothèse d'un épitope T dans la portion C-terminale de gp53, ceux des souris immunisées avec gp53 produisant au moins deux fois plus d'interféron que ceux des souris injectés avec la forme tronquée de gp53 quelque soit la voie (figure 15). On se rappelle que les lymphocytes activés produisent des cytokines pour induire

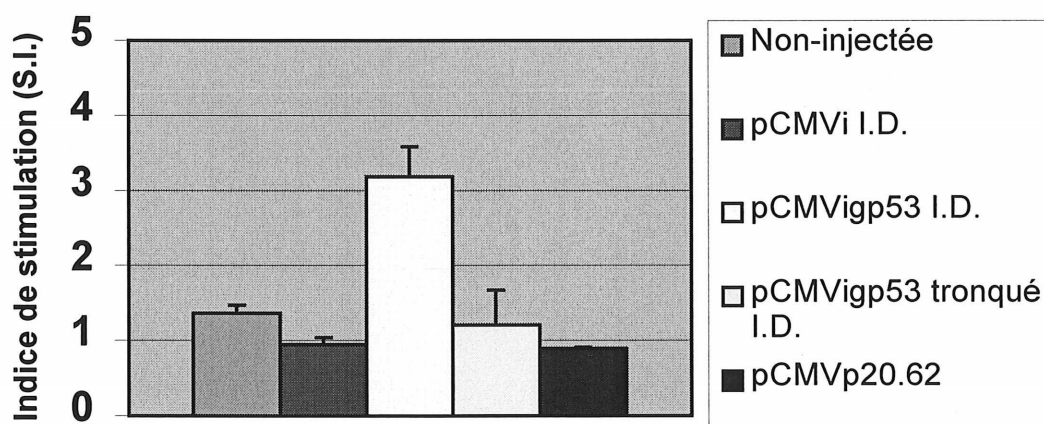


**Figure 13 : Prolifération des splénocytes de souris vaccinées à l'ADN par la voie intramusculaire suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I) ou hétérologue (125; type II).**

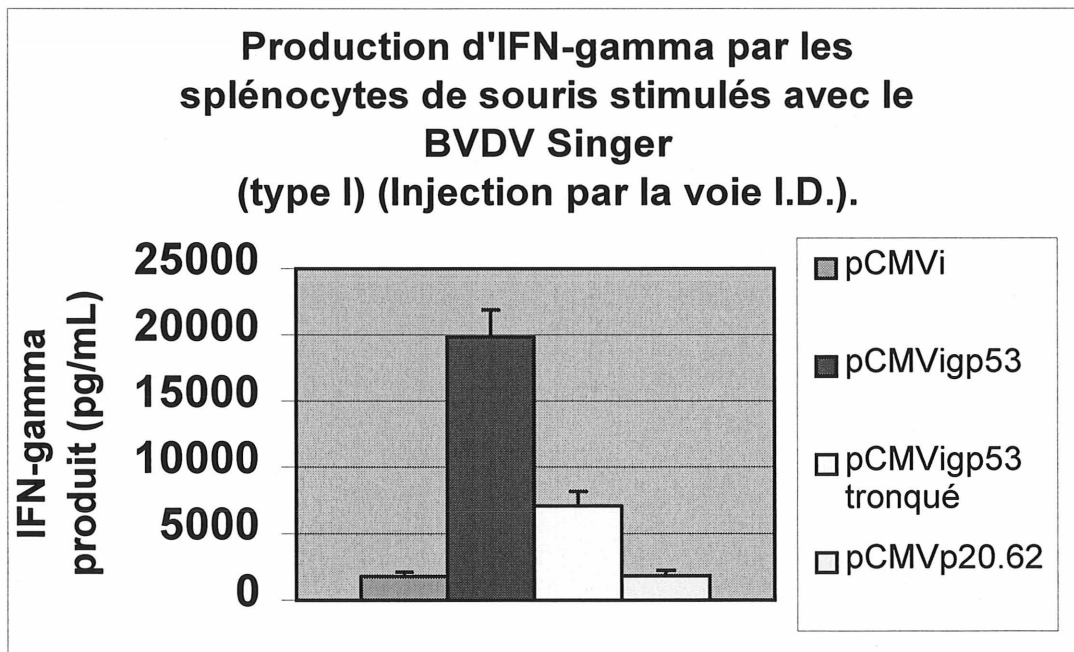
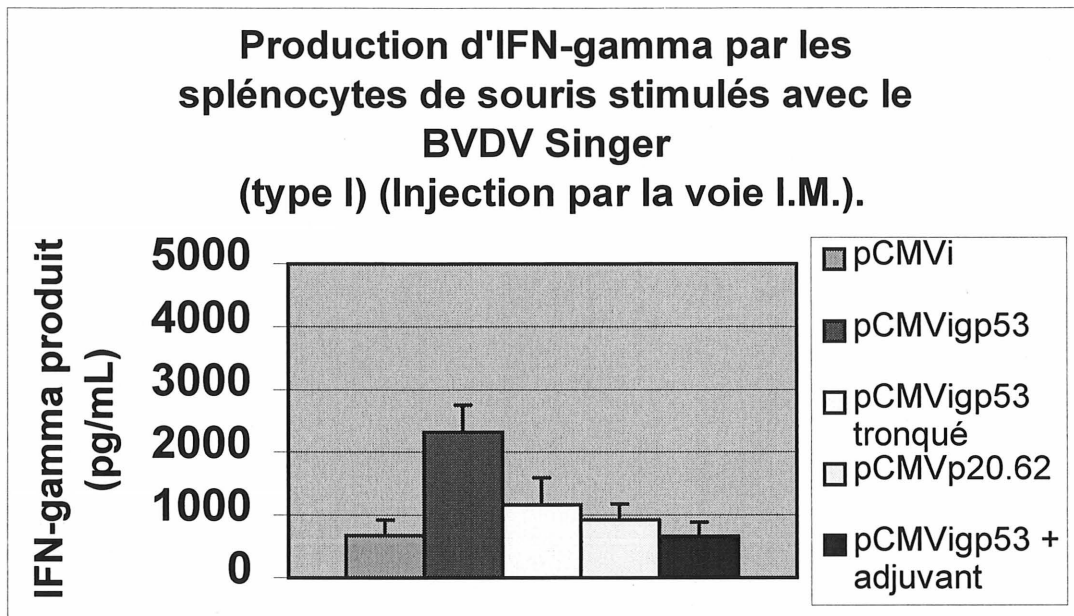
**Prolifération des lymphocytes murins suite à  
la stimulation avec le BVDV Singer (type II)  
(injection par la voie I.D.)**



**Prolifération des lymphocytes murins suite à  
la stimulation avec le BVDV 125 (type II)  
(injection par la voie I.D.)**



**Figure 14 : Prolifération des splénocytes de souris vaccinées à l'ADN par la voie intradermique suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I) ou hétérologue (125; type II).**



**Figure 15 : Production d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes de souris vaccinées à l'ADN suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I).**

la phase effectrice de la réponse immunitaire. Donc, moins de présentation de l'antigène (manque un épitope important), moins d'activation des cellules T et moins de cytokines produites pour la forme tronquée.

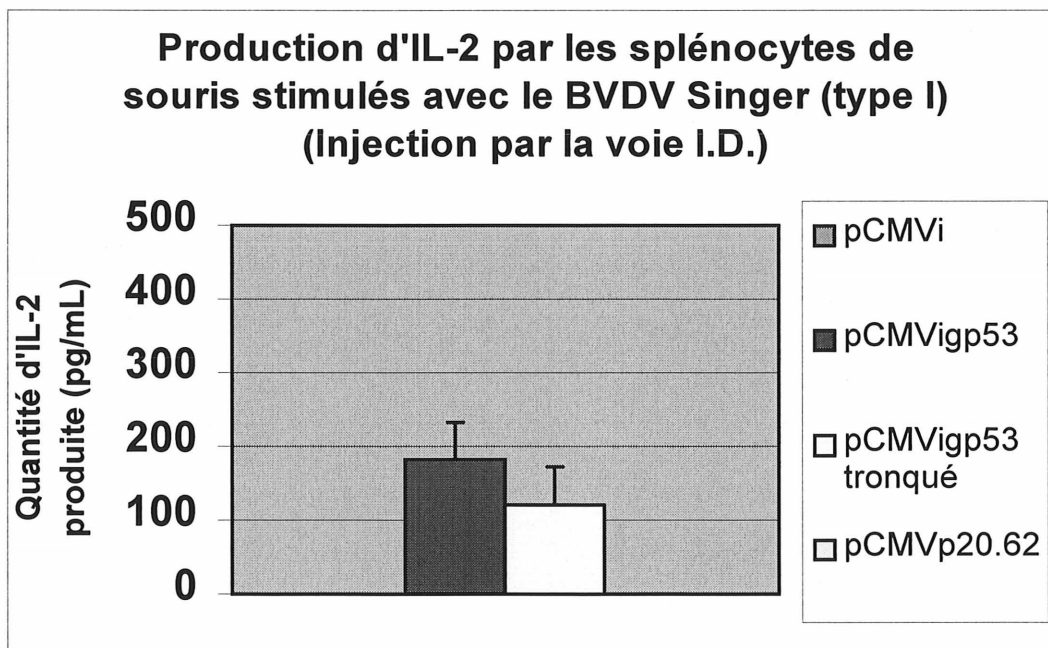
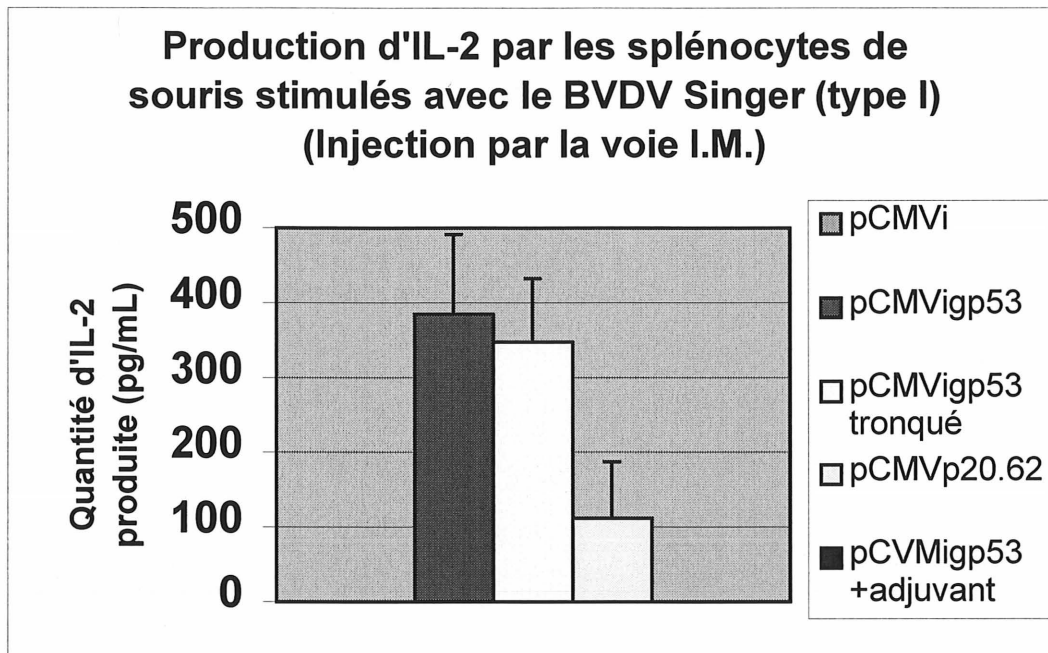
Peu importe la voie d'injection, la prolifération des splénocytes se fait non seulement en présence de la souche virale Singer (type I) mais également en présence de la souche virale 125 (type II) pour les souris immunisées avec gp53 (figure 13 et 14). L'indice de stimulation (S.I.) se situe à  $3,92 \pm 0,49$  en employant la souche Singer comme stimulant spécifique alors que l'utilisation de la souche 125 génère une S.I. de  $3,21 \pm 0,40$  pour les souris immunisés dans la peau. La vaccination avec le gène de la protéine gp53 du BVDV permet donc au système immunitaire de l'hôte de reconnaître des souches hétérologues à celle dont le gène a été utilisé pour l'immunisation (Singer). Comme dans le cas de la protéine E2 chez le CSFV, la faible réponse cellulaire suggère que gp53 ne possède pas d'épitopes majeurs de cellule T (Kimman et al., 1993).

Il est à noter que le groupe de souris ayant reçu l'ADN de gp53 dans un adjuvant ne prolifère pas suite à la stimulation antigénique. La relâche progressive des plasmide du mélange mène probablement à la dégradation des acides nucléiques au lieu de la transfection. Cette hypothèse est supportée par l'abolition de la production d'IFN- $\gamma$  en ce qui concerne l'injection de gp53 avec un adjuvant. La forme complète de gp53 induit une production d'IFN- $\gamma$  se chiffrant à  $2324 \pm 429$  pg/mL alors que l'injection de la même construction dans un adjuvant ne provoque que la production de  $699 \pm 228$  pg/mL, quantité non-spécifique correspondant à la production par le témoin (figure 15).

### **3.11 EFFET DE LA VOIE D'INJECTION SUR LA RÉPONSE CELLULAIRE CONTRE GP53**

La voie d'injection affecte grandement la finalité de la réponse immunitaire cellulaire montée contre gp53. En outre, les souris immunisées avec gp53 par la voie intradermique (figure 14) génère une réponse mémoire supérieure de 64 % par rapport à la voie intramusculaire (figure 13). Puisqu'aucune réponse CTL n'a pu être détectée, la prolifération cellulaire enregistrée est vraisemblablement celle des cellules T auxiliaires. Le niveau de transfection des APC constitue donc la raison majeure de la différence observée entre les voies pour la construction pCMVgp53. Il est reconnu que l'injection par la voie i.d. transfecte plus de cellules présentatrices que celle dans le muscle (Raz *et al.* 1994; Condon *et al.*, 1996), le derme contenant plusieurs cellules présentatrices spécialisées. Par conséquent plus d'antigène est présenté aux cellules T, résultant en une activation cellulaire plus importante. Cela veut donc dire que l'injection par la voie i.d donnera naissance à plus de cellules T mémoires que la voie i.m. d'où la prolifération supérieure de la voie i.d sur la voie i.m.. Sachant que la voie d'injection affectait la réponse cellulaire proliférative, les surnageant des splénocytes stimulés ont été dosés pour les cytokines IL-2, IL-4 et IFN- $\gamma$  afin de caractériser le type de réponse cellulaire et de déterminer l'effet de la voie d'introduction de l'ADN. La production d'IL-2 couplée à celle de l'IFN- $\gamma$  et à l'absence d'IL-4 soulève une réponse des lymphocytes T auxiliaires de type Th1.

La synthèse d'IL-2 constitue un bon indice du nombre de cellules mémoires produites suite à la vaccination. La production d'IL-2 par les lymphocytes T des souris immunisées est significativement inférieure pour les souris injectées par la voie I.D. par rapport à la voie I.M. (figure 16). En effet, on note une production de  $385 \pm 112$  pg/mL d'IL-2 par la voie I.M. pour la forme complète de gp53 tandis que la voie I.D. ne génère que  $182 \pm 49$  pg/mL. De la même façon, la forme tronquée de gp53 donne  $348 \pm 87$  pg/mL d'IL-2 par la voie I.M. contre seulement  $121 \pm 82$  pg/mL d'IL-2 par la voie I.D.. En regardant la production d'IL-2, on



**Figure 16 : Production d'IL-2 par les splénocytes de souris vaccinées à l'ADN suite à la stimulation avec le BVDV de souche homologue (Singer; type I).**



pourrait croire que l'injection i.m. induit la formation d'une plus grande quantité de cellules mémoires que l'administration d'ADN par la voie intradermique. Toutefois, on obtient une prolifération supérieure pour l'injection dans la peau que dans le muscle. Comme les cellules T possèdent la propriété de proliférer (phénomène d'expansion clonale) suite à la stimulation avec IL-2, alors pourquoi observe-t-on moins de prolifération avec les splénocytes des souris injectées par la voie intramusculaire alors qu'ils produisent plus d'IL-2 ? Un élément de réponse se trouve dans la production de prostaglandines. Lors d'une réponse inflammatoire trop importante, caractérisée par une production d'IFN- $\gamma$ , la cyclooxygénase de quelques types cellulaires dont les macrophages s'active et produit de la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) (Liew, 1995). Ce médiateur provoque une inhibition de la production d'IL-2 par les splénocytes et par conséquent inhibe la prolifération cellulaire (Fu et Blankenhorn, 1992). Dans le cas de l'injection dans le derme, on observe une production beaucoup plus élevée d'IFN- $\gamma$  que celle dans le muscle. On pourrait donc penser que la production trop importante d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes ayant subi une immunisation par la voie intradermique aurait inhibé la production de l'IL-2 par le biais de PGE<sub>2</sub>. Cela pourrait expliquer pourquoi l'on retrouve plus d'IL-2 pour la voie intramusculaire qu'intradermique. Probablement que le dosage des cytokines après une journée de stimulation aurait prodigué des résultats tout autres. En terme de différence de production d'IL-2 entre les constructions, on ne retrouve pas de différence significative entre les constructions pCMVigp53 et pCMVigp53 $\Delta$ TMR peu importe la voie.

La voie d'injection possède également un effet sur la production d'IFN- $\gamma$  (figure 15). La production d'IFN- $\gamma$  est beaucoup plus élevée pour la voie I.D. et ce d'un facteur de 8.5 pour gp53 et 6 pour sa forme tronquée. La production d'IFN- $\gamma$  supporte donc la théorie que la voie i.d. permet directement la transfection des APC et donc favorise la présentation de l'antigène par rapport à l'injection dans le muscle. Plus de présentation par les APC, plus d'activation de cellules T auxiliaires et donc plus de production d'IFN- $\gamma$  pour la voie i.d. par rapport à la voie i.m..

### **3.12 RÉPONSE CELLULAIRE DIRIGÉE CONTRE P20, P14, GP25 ET GP48**

L'absence de réponse proliférative pour la construction de pCMVp20.62 (p20, p14, gp25 et gp48) (figures 13 et 14) ne veut pas nécessairement dire que les gènes de ce plasmide ne possèdent pas d'épitopes T. Encore une fois, la compétition antigénique pour les molécules de classe I par les différents gènes pourrait également masquer la présence de ces derniers. De plus, l'immunosuppression causée par gp48 constitue une autre possibilité pour expliquer l'absence de détection d'une réponse mémoire. Finalement l'absence de p20 dans le virus utilisé pour la stimulation pourrait constituer une autre raison de l'absence de mitogénicité.

À noter que l'injection du plasmide p20.62 par la voie I.M. induit la production d'IL-2 par les lymphocytes à un niveau atteignant  $112 \pm 81$  pg/mL, alors que la voie I.D. n'en produit pas (figure 16). On pourrait donc spéculer qu'il y a un antigène dans la construction qui induit une réponse cellulaire qui serait partiellement masquée par les autres gènes vu l'immunosuppression et la compétition antigénique.

## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION**

Cette étude sur la vaccination à l'ADN contre le BVDV se proposait d'étudier des possibilités pour l'élaboration d'un vaccin de deuxième génération en déterminant l'effet de la localisation de la glycoprotéine gp53 sur la réponse immunitaire montée au niveau du modèle murin. À même titre, l'effet de la voie d'injection, intramusculaire versus intradermique, du gène de gp53 sur l'immunité fut caractérisé. Finalement, la réponse immunitaire montée par les gènes p20, p14, gp48 et gp25 contenus dans un seul et unique vecteur fut déterminée afin d'identifier de potentiels nouveaux gènes pouvant contribuer à la protection contre le BVDV par vaccination génétique.

#### **4.1 EFFET DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE GP53**

Les résultats obtenus démontrent que la localisation cellulaire de gp53 influence à la fois la réponse humorale et cellulaire suite à l'immunisation à l'ADN. En effet, la sécrétion de la glycoprotéine dans le milieu extracellulaire permet d'augmenter la dose d'antigène intact disponible (Boyle et al., 1997) pour interagir avec les cellules B et initier la production d'immunoglobulines. Il en résulte une augmentation des titres d'anticorps et de la fréquence des séroconvertants présentant des titres appréciables. En regardant les résultats de la prolifération générés contre les deux constructions, on peut se rendre compte que le facteur limitant dans la production d'immunoglobulines est bel et bien la quantité d'antigène intact disponible pour interagir avec les cellules B. Cette portion des résultats sont en accord avec ceux obtenus par Xiang et ses collaborateurs (1995) ainsi que ceux de Boyle et al. (1997). Par contre, les résultats au niveau de l'immunité cellulaire ne corrobore leurs résultats. La prise de l'antigène libre en circulation par les APC, suite à la sécrétion de gp53, aurait dû en théorie favoriser la présentation de l'antigène, et par conséquent la réponse cellulaire des lymphocytes T par rapport à la forme transmembranaire. La faible prolifération des cellules T

couplée à la pauvre production d'IFN- $\gamma$ , induite par la vaccination avec le gène de la forme tronquée par rapport à la forme transmembranaire de gp53, soulève l'existence d'un épitope T dans la portion carboxy-terminale de la glycoprotéine virale. L'absence de cet épitope expliquerait donc l'absence de prolifération.

## **4.2 EFFET DE LA VOIE D'INJECTION DE GP53**

La voie d'injection de gp53 constitue un autre facteur qui influence la finalité de la réponse immunitaire. La voie intradermique semble la voie de choix pour la vaccination génétique avec gp53. En outre, cette voie permet la synthèse d'une quantité plus importante d'antigène intact disponible pour interagir avec les cellules B entraînant ainsi une augmentation de la synthèse d'immunoglobulines par rapport à la voie intramusculaire. De plus, la transfection directe des APC, en proportion plus importante pour la voie i.d., permet non seulement d'accélérer la vitesse de séroconversion mais également d'accentuer la réponse cellulaire mémoire. Cette réponse cellulaire amplifiée est caractérisée par une production accrue d'IFN- $\gamma$  par rapport à celle induite par l'injection d'ADN par la voie intramusculaire. La réponse proliférative des cellules T contre les deux génotypes du BVDV chez les souris immunisées par la voie i.d. avec le gène de gp53 est d'une importance capitale pour la vaccination contre le BVDV. Les implications de ce résultat seront discutées plus en détails dans la section réponse hétérologue contre le BVDV par vaccination avec gp53.

## **4.3 IMMUNITÉ CONTRE PCMVp20.62**

Malgré la détection que d'une très faible réponse cellulaire suite à l'immunisation avec la construction regroupant les gènes de p20, p14, gp48 et gp25, les gènes contenus dans le vecteur pCMVp20.62 devraient être analysés individuellement par vaccination à l'ADN. Cette affirmation se base sur les trop grandes possibilités de compétition antigénique et

d'immunosuppression qui pourraient interférer avec la présentation antigénique et les cellules impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte. En conséquence de ces événements, la réponse immunitaire serait fortement réduite. Puisque l'un de ces gènes pourrait contribuer significativement dans l'élaboration d'un vaccin protecteur, il est impératif de déterminer le rôle de ces gènes au niveau de la protection chez le bovin. Si l'on regarde le CSFV, l'homologue du BVDV chez le porc, l'utilisation d'un vecteur recombinant codant pour les protéines correspondantes à celles contenues à p20.62 sans la protéine E1 (gp48) permet de conférer une protection partielle aux porcs contre un challenge avec le CSFV (Rumenapf *et al.*, 1991).

#### **4.4 RÉPONSE HÉTÉROLOGUE CONTRE LE BVDV PAR VACCINATION À L'ADN AVEC GP53**

Lors de ces expériences, nous avons eu la chance de constater que l'immunisation à l'ADN à l'aide du gène complet ou partiel de gp53 permettait aux souris de développer des réponses humorales et cellulaires hétérologues contre gp53. Ces réponses sont d'une importance fondamentale pour la vaccination contre le BVDV. En effet, comme la variation antigénique est importante chez le BVDV, l'élaboration d'un vaccin efficace se doit de couvrir un large spectre de souches virales. Afin d'atteindre cet objectif, les vaccins conventionnels sont obligés d'incorporer plusieurs souches virales. Présentement, on fait une rotation de plusieurs vaccins inactivés pour atteindre un niveau de protection acceptable contre le virus (Bolin, 1995). En obtenant une réponse hétérologue avec le gène gp53, cela signifie que le vaccin provoque une réponse immunitaire non seulement contre la souche contre laquelle l'animal a été immunisé, mais également contre des souches qui ne sont pas homologues à la souche vaccinale. Le vaccin génétique pourrait donc conférer une protection de plus large spectre que les vaccins conventionnels.

Les anticorps neutralisants produits contre un génotype de BVDV ne possèdent pas la même capacité de neutralisation contre tous les génotypes. En effet, sérum contenant des anticorps neutralisants montés contre une souche peuvent s'avérer plus de 30 fois moins efficaces dans la neutralisation de souches hétérologues (Toth *et al.*, 1999). C'est pourquoi on n'a pas eu la possibilité de corréler la production d'anticorps neutralisants avec la protection contre un challenge hétérologue contre le virus. Par contre, la protection contre le BVDV a pu être associée avec l'immunité à médiation cellulaire. En effet, en utilisant un vaccin atténué de type I, le groupe de Cortese *et al.* (1998) a démontré que l'induction d'une réponse cellulaire corrélait avec la protection contre une infection avec une souche virulente de type II. De plus, des expériences avec un vaccin inactivé par notre groupe confirment ces résultats (Y. Chorfy; communication personnelle; Harpin *et al.*, 1999). Par conséquent, pour obtenir une protection maximale, les futures stratagèmes de vaccination devraient mettre davantage l'accent sur le développement de la réponse cellulaire. L'utilisation de la forme tronquée de gp53 est donc à proscrire pour les prochains essais chez le bovin puisque cette forme de l'antigène présente une réponse cellulaire mémoire limitée. De plus, l'utilisation de la protéine recombinante tronquée de gp53 ne donne qu'une protection partielle chez les veaux (Bolin et Ridpath, 1996). L'injection de la forme complète de gp53 par la voie intradermique, au lieu d'intramusculaire, augmente non seulement la réponse humorale, mais cellulaire chez la souris. Il est à prévoir que ce changement de voie améliorerait la protection générée par le vaccin. Dans l'optique de poursuivre dans cette direction, la mise au point d'une stratégie de vaccination employant un régime d'immunisation différentiel devrait amplifier la réponse cellulaire.

#### **4.5 USAGE D'UN RÉGIME D'IMMUNISATION DIFFÉRENTIEL POUR AMPLIFIER LA RÉPONSE CELLULAIRE**

Le régime d'immunisation différentiel est une des stratégies permettant de moduler et d'amplifier la réponse immunitaire. Il incorpore deux types de vaccins, soit un qui est utilisé

pour initier la réponse immunitaire et un autre pour l'intensifier. La meilleure stratégie emploierait l'immunisation à l'ADN codant pour gp53 comme vaccin pour initier la réponse et un vecteur recombinant codant pour gp53 pour amplifier la réponse. Cet ordre est important puisque la vaccination génétique donne des réponses d'une spécificité supérieure mais de faible amplitude alors que les vecteurs recombinants donnent des réponses de forte amplitude mais de spécificité plus faible. La plus grande spécificité apportée par la vaccination génétique provient de la faible production d'antigène qui permet une meilleure sélection des cellules qui initient la réponse (seuil d'activation). Les vecteurs recombinants induisent la production d'importantes quantités d'antigènes et favorisent donc l'obtention de réponses plus fortes. L'utilisation séquentielle de ces deux vaccins recombinants combinent donc à la fois spécificité et amplitude. Des exemples de telles stratégies sont fournies dans le tableau 12. Si l'on examine le cas de la protéine de l'enveloppe du HIV, on peut voir que cette tactique d'immunisation amplifie non seulement la réponse humorale (Fuller *et al.*, 1997) mais également cellulaire auxiliaire et cytotoxique (Kent *et al.*, 1998). L'usage de cette stratégie pour la vaccination avec gp53 mérite que l'on y accorde plus d'attention lors de prochains essais chez le bovin.

#### **4.6 AUTRES AVENUES POUR LA VACCINATION**

Il est possible que la vaccination avec gp53 seulement puisse s'avérer insuffisante pour induire une protection complète du bovin et que d'autres gènes puissent contribuer significativement à la défense de l'hôte contre le BVDV. C'est pourquoi d'autres avenues doivent être explorées. On sait que l'immunosuppression causée par le BVDV, rôle associé à gp48 (Bruschke *et al.*, 1997a), est le facteur le plus déterminant qui contribue à l'induction de maladies respiratoires et entériques causées par le BVDV (van Oirschot *et al.*, 1999). Par conséquent, la neutralisation de l'activité apoptotique de gp48, par des anticorps capables de neutraliser cette protéine, pourrait jouer un rôle décisif dans la protection contre la diarrhée virale bovine.

**Tableau 12 : Régimes d'immunisation différentiels combinant la vaccination à l'ADN et les vecteurs recombinants.**

<i>Immunisation Primaire (Priming)</i>	<i>Immunisation secondaire (Boost)</i>	<i>Antigène et nom du pathogène</i>	<i>Caractéristiques de la réponse par rapport au régime homologue</i>	<b>Référence</b>
ADN	Virus de la vaccine et Fowlpox recombinant	$\beta$ -gal de <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la réponse CTL.</li> </ul>	Irvine <i>et al.</i> , 1997.
ADN	Virus de la vaccine	<i>env</i> du HIV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la réponse humorale (titre 1:2000000).</li> </ul>	Fuller <i>et al.</i> , 1997.
ADN	Fowlpox recombinant	<i>env, gag</i> et <i>pol</i> du HIV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la réponse T auxiliaire.</li> <li>• Augmentation de la réponse CTL.</li> </ul>	Kent <i>et al.</i> , 1998.
ADN	Fowlpox recombinant	HIV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la réponse CTL.</li> </ul>	Robinson <i>et al.</i> , 1999.
ADN	Virus de la vaccine	CSP <i>Plasmodium yoelli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la réponse humorale</li> <li>• Augmentation de la réponse CTL.</li> <li>• Augmentation de la protection</li> </ul>	Sedegah <i>et al.</i> , 1998
ADN	Virus de la vaccine	<i>gag</i> du HIV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la réponse CTL</li> <li>• Augmentation IFN-<math>\gamma</math></li> </ul>	Hanke <i>et al.</i> , 1998.



La réponse cytotoxique constitue un des paramètres les plus importants dans l'immunité contre les pathogènes intracellulaires dont les virus. Une autre voie méritant l'exploration est l'identification d'épitopes cytotoxiques puisque l'on sait déjà que le BVDV induit une réponse cytotoxique (Howard *et al.*, 1992; Beer *et al.*, 1997).

#### **4.6.1 Immunisation contre gp48**

Comme gp48 joue un rôle majeur dans la pathogénèse, la stimulation de l'immunité humorale contre cette protéine est importante. En appliquant différentes stratégies de mutagenèse pour changer certains motifs d'acides aminés, il pourrait être possible de diminuer le potentiel apoptotique de la protéine et conserver l'intégrité de structure de la protéine. De cette façon, on pourrait amplifier l'immunité contre la protéine native en évitant la mort des lymphocytes responsables de l'induction de la réponse immunitaire. Cette étape pourrait se faire *in vitro* à l'aide de lymphocytes bovins en culture en présence de diverses formes de gp48 recombinantes purifiées. Le degré d'apoptose pourrait ainsi être mesuré à l'aide de marqueurs et la protéine recombinante la plus appropriée sélectionnée pour faire l'objet d'essais de vaccination. De plus, la fusion d'un bon épitope T à la protéine pourrait stimuler davantage l'immunité à médiation cellulaire et renforcer la réponse humorale obtenue en favorisant la maturation et l'expansion clonale des cellules B. La neutralisation de l'immunosuppression par gp48 pourrait constituer la clef d'une stratégie de vaccination efficace contre le BVDV.

#### **4.6.2 Identification d'épitopes cytotoxiques**

Une des étapes primordiales dans l'élaboration d'un vaccin consisterait à caractériser la réponse cytotoxique contre toutes les protéines du BVDV, soit en clonant tous les gènes et en les injectant à des bovins différents, ou encore en injectant le virus aux bovins et poursuivre avec des tests de cytotoxicité *in vitro* avec des lignées cellulaires exprimant des

transgènes du BVDV couvrant tout le génome pour cibler les épitopes CTL du BVDV. Suite à leur identification, l'implication de ces épitopes dans la réponse immunitaire protectrice devra être évaluée pour l'incorporation éventuelle dans un nouveau vaccin. De plus, les protéines ou les épitopes intéressants pourraient être fusionnés à l'ubiquitine pour favoriser le développement d'une réponse cytotoxique plus forte (Wu et Kipps, 1997; Rodriguez *et al.*, 1997 et 1998). La coinjection de cytokines de type Th1, telles l'IL-12 et l'IL-18, pourrait également être utilisée pour amplifier la réponse cellulaire cytotoxique (Kim *et al.*, 1998).

## **CONCLUSION**

Les résultats recueillis démontrent que la localisation et la voie d'injection de la glycoprotéine 53 du BVDV affecte la réponse immunitaire, tant au niveau humoral que cellulaire. En augmentant la dose d'antigène intact pour la stimulation des cellules B, la forme sécrétée de gp53 permet l'obtention de titres d'immunoglobulines supérieurs à ceux générés par la forme native de la protéine, quelle que soit la voie. Par contre, comparativement à la forme native de gp53, la forme délétée du gène induit une réponse proliférative significativement inférieure, suggérant la présence d'un épitope T dans la portion C-terminale de la glycoprotéine. Contrairement à la forme tronquée de la glycoprotéine, gp53 engendre la production d'une réponse cellulaire hétérologue contre la souche virale 125. Cette réponse est extrêmement intéressante en ce sens qu'elle pourrait donner un spectre de protection plus large, limitant ainsi le nombre de variants antigéniques viraux à incorporer pour obtenir un vaccin cliniquement efficace. Les résultats prouvent également que l'injection dans le derme donne une réponse immunitaire supérieure à celle dans le muscle.

Le criblage des gènes p20, p14, gp48 et gp25, afin de trouver des antigènes potentiels pour l'immunisation de bovins par vaccination à l'ADN, révèle qu'un de ces gènes possède un épitope T déclenchant d'une réponse cellulaire. Le clonage de chacun de ces gènes dans un plasmide et leur injection subséquente chez la souris pourrait permettre d'identifier le gène responsable.

Vu que la réponse cellulaire est d'une importance capitale dans la protection contre le BVDV, des stratégies visant à l'amplifier devraient être considérées dans les prochains essais chez le bovin. L'utilisation d'un régime d'immunisation différentiel combinant la forme complète de gp53 sous forme plasmidique suivie d'un rappel d'injection avec un vecteur recombinant codant pour gp53 semble le meilleur candidat dans l'élaboration d'un éventuel vaccin.

## ANNEXE 1 - EXEMPLE DE CALCUL DU TCID<sub>50</sub>

À partir des données du tableau ci-dessous, on peut se rendre compte que la dose infectieuse nécessaire pour infecter 50% des puits se situe entre les dilutions 10<sup>-6</sup> (60%) et 10<sup>-7</sup> (20%).

Dilution virale utilisée	Nombre de puits infectés	Nombre cumulatif de puits infectés	Nombre cumulatif de puits non-infectés
10 <sup>-5</sup>	5/5	9	0
<b>10<sup>-6</sup> (A)</b>	3/5 (60%)	<b>4</b>	<b>2</b>
10 <sup>-7</sup>	1/5 (20%)	1	6
10 <sup>-8</sup>	0/5	0	11

En trouvant la distance proportionnelle entre les dilutions, on pourra obtenir une approximation du TCID<sub>50</sub>.

$$\begin{aligned}\text{Distance proportionnelle} &= \frac{(\% \text{ de positifs en haut de } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ de positifs en haut de } 50\% - \% \text{ de positifs en bas de } 50\%)} \\ &= \frac{4/6 - 50\%}{(4/6 - 1/6)} \\ &= 0,3\end{aligned}$$

La dilution infectant 50% des puits inoculés correspond à l'ID<sub>50</sub>.

$$\log \text{ID}_{50} = \log A + (\text{distance proportionnelle} \times \log \text{facteur de dilution})$$

où A = dilution virale donnant plus de 50 % d'infection

$$\log \text{ID}_{50} = -6 + (0,3 \times -1)$$

$$\text{ID}_{50} = 10^{-6,3}$$

À partir de cette donnée, on peut obtenir le  $\text{TCID}_{50}$  en utilisant sa réciproque en tenant compte du volume utilisé pour infecter les cellules.

$$n \text{ TCID}_{50} / \text{mL} = 10^{6.3} / 0,05 \text{ mL (quantité inoculée)} = 10^{7.6} \text{ TCID}_{50} / \text{mL}$$

## **BIBLIOGRAPHIE**

ABBAS, A.K., A.H. LICHTMAN et J.S. POBER. 1997. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, Montréal, 494 p.

AMES, T.R. 1986. The causative agent of BVD : its epidemiology and pathogenesis. Vet. Med. 81: 848-869.

ANDERSON, M.L. 1994. Peracute bovine viral diarrhea reportedly spreading. Am. Vet. Med. Assoc. 205: 391-392.

AUSUBEL, F.M., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.D. SEIDMAN, J.A. SMITH et K. STRULH. 1995. Pp. 3.17 dans Short protocols in molecular biology. 3e édition. Wiley and Sons. N.Y..

BAKER, J.A., C.J. YORK et J.H. GILLESPIE. 1954. Virus diarrhea in cattle. Am. J. Vet. Res. 15: 525-528.

BAKER, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190 (11): 1449-1458.

BAKER, J.C. 1990. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. Rev. Sci. Tech. 9 (1): 25-41.

BAKER, J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. Vet Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11 (3): 425-445.

BEER, M., G. WOLF, J. PICHLER, A. WOLFMEYER et O.R. KAADEN. 1997. Cytotoxic T-lymphocyte responses in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. Vet. Microbiol. 58 (1): 9-22.

BOLIN, S.R., A.W. MCCLURKIN, R.C. CUTLIP et M.F. CORIA. 1985. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus. Am. J. Vet. Res. 46 (3): 573-576.

BOLIN, S.R., V. MOENNIG, N.E. KELSO GOURLEY et J. RIDPATH. 1988. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. Arch. Virol. 99 (1-2): 117-123.

**BOLIN, S.R. et J.F. RIDPATH. 1989. Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhea virus vaccines. Am. J. Vet. Res. 50 (6): 817-821.**

**BOLIN, S.R., E.T. LITTLEDIKE et J.F. RIDPATH. 1991a. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. Am. J. Vet. Res. 52 (7): 1033-1037.**

**BOLIN, S.R., P.J. MATTHEWS et J.F. RIDPATH. 1991b. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine viral diarrhea virus. J. Vet. Diagn. Invest. 3 (3): 199-203.**

**BOLIN, S.R. et J.F. RIDPATH. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. Am. J. Vet. Res. 53 (11): 2157-2163.**

**BOLIN, S.R. 1993. Immunogens of bovine viral diarrhea virus. Vet. Microbiol. 37 (3-4): 263-271.**

**BOLIN, S.R. 1995. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11 (3): 615-625.**

**BOLIN, S.R. et J.F. RIDPATH. 1996. Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. Arch. Virol. 141 (8): 1463-1477.**

**BOULANGER, D., S. WAXWEILER, L. KARELLE, M. LONCAR, B. MIGNON, J. DUBUISSON, E. THIRY et P.P. PASTORET. 1991. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. J. Gen. Virol. 72 (5) : 1195-1198.**

**BOULANGER, D., A. VANDERPLASSCHEN, J. DUBUISSON et P.P. PASTORET. 1993. Entry of bovine viral diarrhea virus. Abstracts of the IXth International Congress of Virology Glasgow, p. 148.**

**BOURNE, N., L.R. STANBERRY, D.I. BERNSTEIN et D. LEW. 1996. DNA immunization against experimental genital herpes simplex virus infection. J. Infect. Dis. 173 (4): 800-807.**

**BOYER, J.D., K.E. UGEN, B. WANG, M. AGADJANYAN, L. GILBERT, M.L. BAGARAZZI, M. CHATTERGOON, P. FROST, A. JAVADIAN, W.V. WILLIAMS, Y. REFAELI, R.B. CICCARELLI, D. MCCALLUS, L. CONEY et D.B. WEINER. 1997b.**

Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat. Med.* 3 (5): 526-532.

BOYLE, J.S., C. KONIARAS et A.M. LEW. 1997. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int. Immunol.* 9: 1897-1906.

BOYLE, J.S., J.L. BRADY, C. KONIARAS et A.M. LEW. 1998b. Inhibitory effect of lipopolysaccharide on immune response after DNA immunization is route dependant. *DNA Cell Biol.* 17 (4): 343-348.

BRINKMANN, V., T. GEIGER, S. ALKAN et C.H. HEUSSER. 1993. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 178 (5): 1655-1663.

BROWNLIE, J., M.C. CLARKE et C.J. HOWARD. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 114 (22): 535-536.

BROWNLIE, J. 1990. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 23 (1-4): 371-382.

BROWNLIE, J. 1991. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol. Suppl.* 3: 79-96.

BROWNLIE, J., M.C. CLARKE, L.B. HOOPER et G.D. BELL. 1995. Protection of bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.* 137:58-62.

BRUSCHKE, C.J., M.M. HULST, R.J. MOORMANN, P.A. VAN RIJN et J.T. VAN OIRSCHOT. 1997a. Glycoprotein E2 of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol.* 71 (9): 6692-6696.

BRUSCHKE, C.J., R.J. MOORMANN, J.T. VAN OIRSCHOT et P.A. VAN RIJN. 1997b. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine* 15 (17-18): 1940-1945.

BRUSCHKE, C.J., J.T. VAN OIRSCHOT et P.A. VAN RIJN. 1999. An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine* 17 (15-16): 1983-1991.



- CAMPO, M.S. et W.F. JARRETT. 1994. Vaccination against cutaneous and mucosal papillomavirus in cattle. Ciba Found. Symp. 61-73.
- CHAPMAN, B.S., R.M. THAYER, K.A. VINCENT et N.L. HAIGWOOD. 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 19 (14): 3979-3986.
- CHATTERGOON, M., J. BOYER et D.B. WEINER. 1997. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. FASEB J. 11 (10): 753-763.
- CHILDS, T. 1946. X-disease of cattle. Can. J. Comp. Med. 10: 316-319.
- COLLETT, M.S., R. LARSON, C. GOLD, D. STRICK, D.K. ANDERSON et A.F. PURCHIO. 1988a. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. Virology 165 (1): 191-199.
- COLLETT, M.S., R. LARSON, S.K. BELZER et E. RETZEL. 1988b. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. Virology 165 (1): 200-208.
- COLLETT, M.S., V. MOENNIG et M.C. HORZINEK. 1989. Recent advances in pestivirus research. J. Gen. Virol. 70 (Pt 2): 253-266.
- COLLETT, M.S. 1992. Molecular genetics of pestiviruses. Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 15 (3): 145-154.
- COLLINS, M.E., M. DESPORT et J. BROWNLIE. 1999. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. Virology 259 (1): 85-98.
- CONDON, C., S.C. WATKINS, C.M. CELLUZZI, K. THOMPSON et L.D. FALO, JR. 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. Nat. Med. 2 (10): 1122-1128.
- CORIA, M.F. et A.W. MCCLURKIN. 1978. Duration of active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in calves. Can. J. Comp. Med. 42 (2): 239-243.
- CORR, M., D.J. LEE, D.A. CARSON et H. TIGHE. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. J. Exp. Med. 184 (4): 1555-1560.

CORTESE, V.S., K. WEST et J. ELLIS. 1996. Clinical and immunologic responses to type 2 BVDV challenge in vaccinated and unvaccinated calves. BCVA Edinburgh 610-613.

CORTESE, V.S., K.H. WEST, L.E. HASSARD, S. CARMAN et J.A. ELLIS. 1998. Clinical and immunological responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. J. Am. Vet. Med. Ass. 1 : 1312-1319.

DAVIS, H.L., M.L. MICHEL et R.G. WHALEN. 1993. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. Hum. Mol. Genet. 2 (11): 1847-1851.

DAVIS, H.L., M. MANCINI, M.L. MICHEL et R.G. WHALEN. 1996. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. Vaccine 14 (9): 910-915.

DAVIS, H.L., C.L. BRAZOLOT MILLAN, M. MANCINI, M.J. MCCLUSKIE, M. HADCHOUEL, L. COMANITA, P. TIOLLAIS, R.G. WHALEN et M.L. MICHEL. 1997. DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice. Vaccine 14 (8): 849-852.

DECK, R.R., C.M. DEWITT, J.J. DONNELLY, M.A. LIU et J.B. ULMER. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. Vaccine 15 (1): 71-78.

DENG, R. et K.V. BROCK. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. Virology 191 (2): 867-869.

DEREGT, D., S.R. BOLIN, H.J. VAN DEN, J.F. RIDPATH et S.A. GILBERT. 1998a. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. Virus Res. 53 (1): 81-90.

DEREGT, D., P.A. VAN RIJN, T.Y. WIENS et H.J. VAN DEN. 1998b. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhea virus define three antigenic domains involved in neutralization. Virus Res. 57 (2): 171-181.

DOE, B., M. SELBY, S. BARNETT, J. BAENZIGER et C.M. WALKER. 1996. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (16): 8578-8583.

DONIS, R.O. et E.J. DUBOVI. 1987. Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells. J. Gen. Virol. 68 (6): 1607-1616.

DONIS, R.O., W. CORAPI et E.J. DUBOVI. 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 6): 77-86.

DONIS, R.O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet Clin. North Am. Food Anim Pract.* 11 (3): 393-423.

DONNELLY, J.J., D. MARTINEZ, K.U.JANSEN, R.W.ELLIS, D.L. MONTGOMERY et M.A. LIU. 1996. Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *J. Infect. Dis.* 173 (2): 314-320.

DONNELLY, J.J., J.B. ULMER, J.W. SHIVER et M.A. LIU. 1997a. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617-648.

DONNELLY, J.J., J.B. ULMER et M.A. LIU. 1997b. DNA vaccines. *Life Sci.* 60 (3): 163-172.

DUFFELL, S.J. et J.W. HARKNESS. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117 (10): 240-245.

DUFFELL, S.J., M.W. SHARP et D. BATES. 1986. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. *Vet. Rec.* 118 (2): 38-39.

EISENBRAUN, M.D., D.H. FULLER et J.R. HAYNES. 1993. Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. *DNA Cell. Biol.* 12 (9): 791-797.

ELAHI, S.M., S. HARPIN, E. CORNAGLIA, B. TALBOT et Y. ELAZHARY. 1997. Antigenic variation among bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains and the role of different cell fixation methods in immunoassays. *Can. J. Vet. Res.* 61 (1): 34-38.

ELAHI, S.M., S.H. SHEN, S. HARPIN, B.G. TALBOT et Y. ELAZHARY. 1999a. Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhoea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Arch. Virol.* 144 (6): 1057-1070.

ELAHI, S.M., J. BERGERON, E. NAGY, B.G. TALBOT, S. HARPIN, S.H. SHEN et Y. ELAZHARY. 1999b. Induction of humoral and cellular immune responses in mice by a recombinant fowlpox virus expressing the E2 protein of bovine viral diarrhoea virus. *FEMS Microbiol. Lett.* 171 (2): 107-114.

ELAHI, S.M., S.H. SHEN, B.G. TALBOT, B. MASSIE, S. HARPIN et Y. ELAZHARY. 1999c. Recombinant adenoviruses expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus induce humoral and cellular immune responses. *FEMS Microbiol. Lett.* 177 (1): 159-166.

ELAHI, S.M., S.H. SHEN, B.G. TALBOT, B. MASSIE, S. HARPIN et Y. ELAZHARY. 1999d. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology* 261 (1): 1-7.

ELLIS, J.A., W.C. DAVIS, E.L. BELDEN et D.L. PRATT. 1988. Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Pathol.* 25 (3): 231-236.

FAILLA, C., L. TOMEI et R. DE FRANCESCO. 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 68 (6): 3753-3760.

FELTQUATE, D.M. 1998. DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J. Cell Biochem. Suppl.* 104 (6): 304-311.

FRANCKI, R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON et F. BROWN. 1991. *Flaviviridae*. *Arch. Virol. Suppl.* 2: 223-233.

FU, Y. et E.P. BLANKENHORN. 1992. Nitric oxide-induced anti-mitogenic effects in high and low responder rat strains. *J. Immunol.* 148 (7): 2217-2222.

FULLER, D.H., M.M. CORB, S. BARNETT, K. STEIMER et J.R. HAYNES. 1997. Enhancement of immunodeficiency virus-specific immune responses in DNA-immunized rhesus macaques. *Vaccine* 15 (8): 924-926.

FYNAN, E.F., R.G. WEBSTER, D.H. FULLER, J.R. HAYNES, J.C. SANTORO et H.L. ROBINSON. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (24): 11478-11482.

GARDNER, M.J., D.L. DOOLAN, R.C. HEDSTROM, R. WANG, M. SEDEGAH, R.A. GRAMZINSKI, J.C. AGUIAR, H. WANG, M. MARGALITH, P. HOBART et S.L. HOFFMAN. 1996. DNA vaccines against malaria: immunogenicity and protection in a rodent model. *J. Pharm. Sci.* 85 (12): 1294-1300.

GAUKROGER, J.M., L.M. CHANDRACHUD, B.W. O'NEIL, G.J. GRINDLAY, G. KNOWLES et M.S. CAMPO. 1996. Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 7): 1577-1583.

GEISSLER, M., A. GESIEN, K. TOKUSHIGE et J.R. WANDS. 1997. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine- expressing plasmids. *J. Immunol.* 158 (3): 1231-1237.

GERLONI, M., R. BILLETТА, S. XIONG et M. ZANETTI. 1997. Somatic transgene immunization with DNA encoding an immunoglobulin heavy chain. *DNA Cell Biol.* 16 (5): 611-625.

GIESE, M. 1998. DNA-antiviral vaccines: new developments and approaches--a review. *Virus Genes* 17 (3): 219-232.

GILLESPIE, J.H., J.A. BAKER et K. MCENTEE. 1960. A cytopathogenic strain of diarrhea virus. *Cornell Vet.* 50: 73-79.

HADDAD, D., S. LILJEQVIST, S. STAHL, I. ANDERSSON, P. PERLMANN, K. BERZINS et N. AHLBORG. 1997. Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody responses in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18 (3): 193-202.

HANKE, T., T.J. BLANCHARD, J. SCHNEIDER, C.M. HANNAN, M. BECKER, S.C. GILBERT, A.V. HILL, G.L. SMITH et A. MCMICHAEL. 1998. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 16 (5): 439-445.

HARLAND, R.J., A.A. POTTER, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, J. VAN DONKERGOED, M.D. PARKER, T.J. ZAMB et E.D. JANZEN. 1992. *Can. Vet. J.* 33: 734-741.

HARLOW, E. et D. LANE. *Antibodies : A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.

HARPIN, S., S.M. ELAHI, E. CORNAGLIA, R.H. YOLKEN et Y. ELAZHARY. 1995. The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhea virus. *Arch. Virol.* 140 (7): 1285-1290.

HARPIN, S., B. TALBOT, M. MBIKAY et Y. ELAZHARY. 1997. Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein gp53 (E2). *FEMS Microbiol. Lett.* 146 (2): 229-234.

HARPIN, S., D.J. HURLEY, M. MBIKAY, B. TALBOT et Y. ELAZHARY. 1999. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 12): 3137-3144.

HEFENEIDER, S.H., S.L. MCCOY, J.I. MORTON, A.C. BAKKE, K.A. CORNELL, L.E. BROWN et R.M. BENNETT. 1992. DNA binding to mouse cells is mediated by cell-surface molecules: the role of these DNA-binding molecules as target antigens in murine lupus. *Lupus* 1 (3): 167-173.

HEGDE, N.R. et S. SRIKUMARAN. 1997. The use of bovine MHC class I allele-specific peptide motifs and proteolytic cleavage specificities for the prediction of potential cytotoxic T lymphocyte epitopes of bovine viral diarrhoea virus. *Virus Genes* 14 (2): 111-121.

HEINZEL, F.P. 1995. Th1 and Th2 cells in the cure and pathogenesis of infectious diseases. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 8: 151-155.

HOLLAND, J., K. SPINDLER, F. HORODYSKI, E. GRABAU, S. NICHOL et S. VANDEPOL. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215 (4540): 1577-1585.

HORZINEK, M.C. 1981. Non-arthropod-borne Togaviruses. Academic Press. London.

HOUE, H. et V. PALFI. 1993. Estimation of herd incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in herds previously without animals persistently infected with BVDV. *Acta Vet. Scand.* 34 (2): 133-137.

HOUE, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64 (2-3): 89-107.

HOWARD, C.J., M.C. CLARKE, P. SOPP et J. BROWNLIE. 1992. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32 (3-4): 303-314.

HOWARD, C.J., M.C. CLARKE, P. SOPP et J. BROWNLIE. 1994. Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Microbiol.* 42: 171-179.

HULST, M.M., G. HIMES, E. NEWBIGIN et R.J. MOORMANN. 1994. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* 200 (2): 558-565.

INCHAUPE, G., L. VITVITSKI, M.E. MAJOR, G. JUNG, U. SPENGLER, M. MAISONNAS et C. TREPO. 1997. Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol.* 16 (2): 185-195.

IRVINE, K.R., R.S. CHAMBERLAIN, E.P. SHULMAN, D.R. SURMAN, S.A. ROSENBERG et N.P. RESTIFO. 1997. Enhancing efficacy of recombinant anticancer vaccines with prime/boost regimens that use two different vectors. *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (21): 1595-1601.

IWASAKI, A., B.J. STIERNHOLM, A.K. CHAN, N.L. BERINSTEIN et B.H. BARBER. 1997a. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *J. Immunol.* 158 (10): 4591-4601.

JUSTEWICZ, D.M., M.J. MORIN, H.L. ROBINSON et R.G. WEBSTER. 1995. Antibody-forming cell response to virus challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 69 (12): 7712-7717.

KAMER, G. et P. ARGOS. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12 (18): 7269-7282.

KENT, S.J., A. ZHAO, S.J. BEST, J.D. CHANDLER, D.B. BOYLE et I.A. RAMSHAW. 1998. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J. Virol.* 72 (12): 10180-10188.

KIM, J.J., N.N. TRIVEDI, L.K. NOTTINGHAM, L. MORRISON, A. TSAI, Y. HU, S. MAHALINGAM, K. DANG, L. AHN, N.K. DOYLE, D.M. WILSON, M.A. CHATTERGOON, A.A. CHALIAN, J.D. BOYER, M.G. AGADJANYAN et D.B. WEINER. 1998. Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur. J. Immunol.* 28 (3): 1089-1103.

KIMMAN, T.G., A.T. BIANCHI, G. WENSVOORT, T.G. DE BRUIN et C. MELIEFSTE. 1993. Cellular immune response to hog cholera virus (HCV): T cells of immune pigs proliferate in vitro upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen. *J. Virol.* 67 (5): 2922-2927.

KIRNBAUER, R., L.M. CHANDRACHUD, B.W. O'NEIL, E.R. WAGNER, G.J. GRINDLAY, A. ARMSTRONG, G.M. MCGARVIE, J.T. SCHILLER, D.R. LOWY et M.S.

CAMPO. 1996. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219 (1): 37-44.

KLINMAN, D.M., A.K. YI, S.L. BEAUCAGE, J. CONOVER et A.M. KRIEG. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7: 2879-2883.

KOWALCZYK, D.W. et H.C.ERTL. 1999. Immune responses to DNA vaccines. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (5): 751-770.

KOZAK, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44 (2): 283-292.

KRIEG, A.M., A.K. YI, S. MATSON, T.J. WALDSCHMIDT, G.A. BISHOP, R. TEASDALE, G.A. KORETZKY et D.M. KLINMAN. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374 (6522): 546-549.

LARSSON, B. et C. FOSSUM. 1992. Bovine virus diarrhoea virus induces in vitro a proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection. *Vet. Microbiol.* 31 (4): 317-325.

LEVINGS, R.L. et S.J. WESSMAN. 1991. Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 75: 177-181.

LEWIS, P.J., G.J. COX, S. DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et L.A. BABIUK. 1997. Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses. *Vaccine* 15 (8): 861-864.

LIEW, F.V.. 1995. Interaction between cytokines and nitric oxide. *Adv. Neuroimmunol.* 5: 201-209.

LISS, B., S. ORBAN, H.R. FREY, G. TRAUTWEIN, W. WIEFEL et H. BLINDOW. 1984. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhea (BVD) vaccine virus in cattle. *Zbl. Vet. Med. B.* 31: 669-681.

LIN, M., K. SPERLE et N. STENBERG. 1992. Studies on extrachromosomal homologous recombination in mammalian cells: implications for chromosomal recombination and gene targeting. Pp. 15-28 dans : *Mechanisms of Eukaryotic DNA Recombination*. Gottesman, M.E et H.J. Vogel. Academic Press, San Diego.



- LIU, M.A., W. MCCLEMENTS, J.B. ULMER, J. SHIVER et J. DONNELLY. 1997. Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 15 (8): 909-912.
- LOBIGS, M., C.E. ARTHUR, A. MULLBACHER et R.V. BLANDEN. 1994. The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology* 202 (1): 195-201.
- LOHR, C.H., J.F. EVERMANN et A.C. WARD. 1983. Investigation of dams and their offspring inoculated with a vaccine contaminated by bovine viral diarrhea virus. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 78: 1263-1266.
- MAGAR, R., H.C. MINOCHA et J. LECOMTE. 1988. Bovine viral diarrhea virus proteins: heterogeneity of cytopathogenic and non-cytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet. Microbiol.* 16 (4): 303-314.
- MANICKAN, E., R.J. ROUSE, Z. YU, W.S. WIRE et B.T. ROUSE. 1995. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 155 (1): 259-265.
- MANTHORPE, M., F. CORNEFERT-JENSEN, J. HARTIKKA, J. FELGNER, A. RUNDELL, M. MARGALITH et V. DWARKI. 1993. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum. Gene Ther.* 4 (4): 419-431.
- MARTINS, L.P., L.L. LAU, M.S. ASANO et R. AHMED. 1995. DNA vaccination against persistent viral infection. *J. Virol.* 69 (4): 2574-2582.
- MCCLEMENTS, W.L., M.E. ARMSTRONG, R.D. KEYS et M.A. LIU. 1996. Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (21): 11414-11420.
- MCCLURKIN, A.W., E.T. LITTLEDIKE, R.C. CUTLIP, G.H. FRANK, M.F. CORIA et S.R. BOLIN. 1984. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can. J. Comp. Med.* 48 (2): 156-161.
- MCDONNELL, W.M. et F.K. ASKARI. 1997. Immunization. *JAMA* 278 (22): 20-2008.
- MCGOWAN, M.R. et P.D. KIRKLAND. 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br. Vet. J.* 151 (3): 263-270.

MESSINA, J.P., G.S. GILKESON et D.S. PISETSKY. 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* 147 (6): 1759-1764.

MEYERS, G., T. RUMENAPF et H.J. THIEL. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171 (2): 555-567.

MEYERS, G., N. TAUTZ, P. BECHER, H.J. THIEL et B.M. KUMMERER. 1996. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* 70 (12): 8606-8613.

MEYLING, A., H. HOUE et A.M. JENSEN. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech.* 9 (1): 75-93.

MONTGOMERY, D.L., J.B. ULMER, J.J. DONNELLY et M.A. LIU. 1997. DNA vaccines. *Pharm. Ther.* 74 (2) : 195-205.

MOR, G., G. YAMSHCHIKOV, M. SEDEGAH, M. TAKENO, R. WANG, R.A. HOUGHTEN, S. HOFFMAN et D.M. KLINMAN. 1996. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. *J Clin. Invest.* 98 (12): 2700-2705.

MOR ,G., M. SINGLA, A.D. STEINBERG, S.L. HOFFMAN, K. OKUDA et D.M. KLINMAN. 1997. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum. Gene Ther.* 8 (3): 293-300.

MUELLER, D.L., M.K. JENKINS et R.H. SCHWARTZ. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 445-480.

NICHOLS, W.W., B.J. LEDWITH, S.V. MANAM et P.J. TROILO. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772: 30-39.

NISKANEN, R., A.LINDBERG, B. LARSSON et A. ALENIUS. 1995. Effects of infection with bovine virus diarrhea virus on health and reproductive performance of 213 dairy herds in one county in Sweden. *Prev. Vet. Med.* 23: 229-237.

OKAMURA, H., H. TSUTSI, T. KOMATSU, M. YUTSUDO, A. HAKURA, T. TANIMOTO, K. TORIGOE, T. OKURA, Y. NUKADA et K. HATTORI. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378 (6552): 88-91.

OKUDA, K., H. BUKAWA, K. HAMAJIMA, S. KAWAMOTO, K.I. SEKIGAWA et Y. YAMADA. 1995. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses

following direct injection of DNA encoding HIV type I env and rev gene-products. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 933-943.

OLAFSON, P., A.D. MACCALLUM et F.H. FOX. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36: 205-213.

OLAFSON, P. et C.G. RICKARD. 1947. Further observations on the virus diarrhea (new transmissible disease) of cattle. *Cornell Vet.* 37: 104-106.

PATON, D.J., J.P. LOWINGS et A.D. BARRETT. 1992. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus [published erratum appears in *Virology* 1992 Dec;191(2):1013]. *Virology* 190 (2): 763-772.

PAULY, T., K. ELBERS, M. KONIG, T. LENGSELD, A. SAALMULLER et H.J. THIEL. 1995. Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 12): 3039-3049.

PELLERIN, C., H.J. VAN DEN, J. LECOMTE et P. TUSSEN. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203 (2): 260-268.

POOLE, T.L., C. WANG, R.A. POPP, L.N. POTGIETER, A. SIDDIQUI et M.S. COLLETT. 1995. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206 (1): 750-754.

POTGIETER, L.N., M.D. MCCracken, F.M. HOPKINS, R.D. WALKER et J.S. GUY. 1984. Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 45 (8): 1582-1585.

POTTS, B.J., M. SAWYER, I.C. SHEKARCHI, T. WISMER et D. HUDDLESTON. 1989. Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell cultures. *J. Virol. Methods* 26 (1): 119-124.

PRINCE, A.M., R. WHALEN et B. BROTMAN. 1997. Successful DNA-based HBV immunization of newborn chimpanzees. *Vaccine* 15 (8): 916-919.

RADOSTITS, O.M. et I.R. LITTLEJOHNS. 1988. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of disease caused by bovine viral diarrhea virus. *Can. Vet. J.* 29: 513-528.

RAMSAY, A.J., K.H. LEONG et I.A. RAMSHAW. 1997. DNA vaccination against virus infection and enhancement of antiviral immunity following consecutive immunization with DNA and viral vectors. *Immunol. Cell Biol.* 75 (4): 382-388.

RAZ, E., D.A. CARSON, S.E. PARKER, T.B. PARR, A.M. ABAI, G. AICHINGER, S.H. GROMKOWSKI, M. SINGH, D. LEW et M.A. YANKAUCKAS. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (20): 9519-9523.

RAZ, E. 1997. Introduction: gene vaccination, current concepts and future directions. *Springer Semin. Immunopathol.* 19 (2): 131-137.

REDDY, J.R., J. KWANG, V. VARTHAKAVI, K.F. LECHTENBERG et H.C. MINOCHA. 1999. Semiliki forest virus vector carrying the bovine viral diarrhea virus NS3 (p80) cDNA induced immune responses in mice and expressed BVDV protein in mammalian cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 22 (4): 231-246.

RIDPATH, J.F., S.R. BOLIN et E.J. DUBOVI. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205 (1): 66-74.

ROBINSON, H.L., D.C. MONTEFIORI, R.P. JOHNSON, K.H. MANSON, M.L. KALISH, J.D. LIFSON, T.A. RIZVI, S. LU, S.L. HU, G.P. MAZZARA, D.L. PANICALI, J.G. HERNDON, R. GLICKMAN, M.A. CANDIDO, S.L. LYDY, M.S. WYAND et H.M. MCCLURE. 1999. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med.* 5 (5): 526-534.

RODRIGUEZ, F., J. ZHANG et J.L. WHITTON. 1997. DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J. Virol.* 71 (11): 8497-8503.

RODRIGUEZ, F., L.L. AN, S. HARKINS, J. ZHANG, M. YOKOYAMA, G. WIDERA, J.T. FULLER, C. KINCAID, I.L. CAMPBELL et J.L. WHITTON. 1998. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J. Virol.* 72 (6): 5174-5181.

ROEDER, P.L. et T.W. DREW. 1984. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Vet. Rec.* 114 (13): 309-313.

ROMAN, M., E. MARTIN-OROZCO, J.S. GOODMAN, M.D. NGUYEN, Y. SATO, A. RONAGHY, R.S. KORNBLUTH, D.D. RICHMAN, D.A. CARSON et E. RAZ. 1997.

Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* 3 (8): 849-854.

RUMENAPF, T., R. STARK, G. MEYERS et H.-J. THIEL. 1991. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J. Virol.* 65 (6): 589-597.

RUMENAPF, T., G. UNGER, J.H. STRAUSS et H.J. THIEL. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* 67 (6): 3288-3294.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2e édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y..

SATO, Y., M. ROMAN, H. TIGHE, D. LEE, M. CORR, M.D. NGUYEN, G.J. SILVERMAN, M. LOTZ, D.A. CARSON et E. RAZ. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273 (5273): 352-354.

SCHIRMBECK, R., W. BOHM, K. ANDO, F.V. CHISARI et J. REIMANN. 1995. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen- specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J. Virol.* 69 (10): 5929-5934.

SCHNEIDER, R., G. UNGER, R. STARK, E. SCHNEIDER-SCHERZER et H.J. THIEL. 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261 (5125): 1169-1171.

SCHWARTZ, R.H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71 (7): 1065-1068.

SEDEGAH, M., T.R. JONES, M. KAUR, R. HEDSTROM, P. HOBART, J.A. TINE et S.L. HOFFMAN. 1998. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (13): 7648-7653.

SHIVER, J.W., H.C. PERRY, M.E. DAVIES, D.C. FREED et M.A. LIU. 1995. Cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772: 198-208.

TAMURA, J.K., P. WARRENER et M.S. COLLETT. 1993. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 193 (1): 1-10.

TANG, D.C., M. DEVIT et S.A. JOHNSTON. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356 (6365): 152-154.

THIEL, H.J., R. STARK, E. WEILAND, T. RUMENAPF et G. MEYERS. 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus [published erratum appears in *J Virol* 1992 Jan;66(1):612]. *J. Virol.* 65 (9): 4705-4712.

TOTH, R.L., P.F. NETTLETON et M.A. MCCRAE. 1999. Expression of the E2 envelope glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) elicits virus-type specific neutralising antibodies. *Vet. Microbiol.* 65 (2): 87-101.

TRINCHIERI, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251-276.

ULMER, J.B., J.J. DONNELLY, S.E. PARKER, G.H. RHODES, P.L. FELGNER, V.J. DWARKI, S.H. GROMKOWSKI, R.R. DECK, C.M. DEWITT et A. FRIEDMAN. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259 (5102): 1745-1749.

ULMER, J.B., J.J. DONNELLY et M.A. LIU. 1996. Toward the development of DNA vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (6): 653-658.

VAN OIRSCHOT, J.T., C.J. BRUSCHKE et P.A. VAN RIJN. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 64 (2-3): 169-183.

VAN RIJN, P.A., A. BOSSERS, G. WENSVOORT et R.J. MOORMANN. 1996. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 11): 2737-2745.

VAN RIJN, P.A., H.G. VAN GENNIP, C.H. LEENDERTSE, C.J. BRUSCHKE, D.J. PATON, R.J. MOORMANN et J.T. VAN OIRSCHOT. 1997. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237 (2): 337-348.

VAN ZIJL, M., G. WENSVOORT, E. DE KLUYVER, M. HULST, G.H. VAN DER, A. GIELKENS, A. BERNIS et R. MOORMANN. 1991. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Virol.* 65 (5): 2761-2765.

VOGELSTEIN, B. ET D. GILLESPIE. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (2) : 615-619.

WAINE, G.J. et D.P. MCMANUS. 1995. Nucleic acids: vaccines of the future. *Parasitology Today* 11: 113-116.

WANG, B., J. BOYER, V. SRIKANTAN, L. CONEY, R. CARRANO, C. PHAN, M. MERVA, K. DANG, M. AGADJANAN et L. GILBERT. 1993. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol.* 12 (9): 799-805.

WARRENER, P. et M.S. COLLETT. 1995. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.* 69 (3): 1720-1726.

WEBER, L.W., W.B. BOWNE, J.D. WOLCHOK, R. SRINIVASAN, J. QIN, Y. MOROI, R. CLYNES, P. SONG, J.J. LEWIS et A.N. HOUGHTON. 1998. Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *J. Clin. Invest.* 102 (6): 1258-1264.

WEBSTER, R.G., E.F. FYNAN, J.C. SANTORO et H. ROBINSON. 1994. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 12 (16): 1495-1498.

WEILAND, E., R. STARK, B. HAAS, T. RUMENAPF, G. MEYERS et H.J. THIEL. 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* 64 (8): 3563-3569.

WENSVOORT, G. et C. TERPSTRA. 1988. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res. Vet. Sci.* 45 (2): 143-148.

WENSVOORT, G., J. BOONSTRA et B.G. BODZINGA. 1990. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 3): 531-540.

WISKERCHEN, M., S.K. BELZER et M.S. COLLETT. 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* 65 (8): 4508-4514.

WOLFF, J.A., R.W. MALONE, P. WILLIAMS, W. CHONG, G. ACSADI, A. JANI et P.L. FELGNER. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247 (4949 Pt 1): 1465-1468.

WOLFF , J.A., J.J. LUDTKE, G. ACSADI, P. WILLIAMS et A. JANI. 1992b. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 1 (6): 363-369.

WU, Y. et T.J. KIPPS. 1997. Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome- dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 159 (12): 6037-6043.

XIANG, Z.Q., S. SPITALNIK, M. TRAN, W.H. WUNNER, J. CHENG et H.C. ERTL. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199 (1): 132-140.

XIANG, Z.Q. et H.C. ERTL. 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2 (2): 129-135.

XIANG, Z.Q., S.L. SPITALNIK, J. CHENG, J. ERIKSON, B. WOJCZYK et H.C. ERTL. 1995. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology* 209 (2): 569-579.

XUE, W. et H.C. MINOCHA. 1993. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 1) 73-79.

YAMAMOTO, S., T. YAMAMOTO, T. KATAOKA, E. KURAMOTO, O. YANO et T. TOKUNAGA. 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* 148 (12): 4072-4076.

YANKAUCKAS, M.A., J.E. MORROW, S.E. PARKER, A. ABAI, G.H. RHODES, V.J. DWARKI et S.H. GROMKOWSKI. 1993. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol.* 12 (9): 771-776.

YOKOYAMA, M., J. ZHANG et J.L. WHITTON. 1995. DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 69 (4): 2684-2688.

YU, M., L.F. WANG, B.J. SHIELL, C.J. MORRISSY et H.A. WESTBURY. 1996. Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses. *Virology* 222 (1): 289-292.